

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRẦN THỊ THU HUYỀN

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA MỘT SỐ GEN
Ở PHỤ NỮ LOÃNG XƯƠNG SAU MÃN KINH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRẦN THỊ THU HUYỀN

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA MỘT SỐ GEN
Ở PHỤ NỮ LOÃNG XƯƠNG SAU MÃN KINH**

Chuyên ngành : Nội – Xương khớp

Mã số : 9720107

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS.BS. NGUYỄN THỊ THANH HƯƠNG
2. PGS.TS. NGUYỄN THỊ NGỌC LAN

HÀ NỘI – 2022

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin chân thành cảm ơn:

Ban Giám hiệu, Bộ môn Nội và Phòng Đào tạo sau Đại học – Trường Đại học Y Hà Nội.

Ban Giám Đốc, Khoa Khám Bệnh, Khoa Cơ Xương Khớp - Bệnh viện Bạch Mai.

Với tất cả lòng yêu mến và sự biết ơn chân thành sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn tới PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan, người thầy đã hướng dẫn tôi tận tình chu đáo trong suốt chặng đường học tập, nghiên cứu khoa học.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thị Thanh Hương, người đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Thầy Cô trong hội đồng từ khi tôi làm nghiên cứu sinh đến nay, đã cho tôi nhiều kiến thức quý báu giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Viện nghiên cứu y học Đinh Tiên Hoàng đã cho phép tôi tham gia đề tài “Xác định tính đa hình và sự nhạy cảm của các gen loãng xương và gãy xương trên người Việt Nam” mã số 106 - YS. 02-2014.29 do quỹ Nafosted tài trợ để tôi có cơ hội hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Bộ môn Sinh Lý học trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi vô cùng biết ơn cha mẹ, chồng và hai con trai, những người luôn là chỗ dựa cũng như là động lực để tôi cố gắng. Xin được cảm ơn sự quan tâm giúp đỡ và những tình cảm quý báu của người thân và bạn bè đã dành cho tôi.

Hà Nội, Ngày 22 /06/2022

Trần Thị Thu Huyền

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Thị Thu Huyền, nghiên cứu sinh khóa 34 Trường đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Nội Cơ Xương Khớp, xin cam đoan:

Đây là luận án do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Thanh Hương và PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan.

1. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

2. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 22 tháng 06 năm 2022

Trần Thị Thu Huyền

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BMD	Bone Mineral Density (mật độ xương)
BMI	Body Mass Index (chỉ số khối cơ thể)
CXĐ	Cổ xương đùi
CSTL	Cột sống thắt lưng
DNA	Deoxyribonucleic acid
DXA	Hấp thụ tia X năng lượng kép (Dual energy X-ray Absorptiometry)
ĐTXĐ	Đầu trên xương đùi
FTO	Liên quan khối mỡ và béo phì (Fat mass and Obesity Associated)
GDF11	Yếu tố tăng trưởng biệt hóa 11 (Growth differentiation factor 11)
HĐTL	Hoạt động thể lực
LRP5	LDL Receptor Related Protein 5
MTHFR	Methylen Tetrahydrofolat Reductase
OPPG	Osteoporosis pseudogliom
pBMD	Mật độ xương đỉnh (Peak bone mineral density)
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction)
PPAR γ	gamma thụ thể kích hoạt chất tăng sinh peroxisome (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
RFLP-PCR	Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribonucleic acid
SNP	Đa hình đơn nucleotid (Single nucleotide polymorphism)
WHO	Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan loãng xương và loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh	3
1.1.1. Định nghĩa loãng xương	3
1.1.2. Chẩn đoán loãng xương	4
1.1.3. Sinh lý học quá trình phát triển xương	6
1.1.4. Định nghĩa mãn kinh	8
1.1.5. Ảnh hưởng của mãn kinh đến loãng xương.....	8
1.1.6. Dịch tễ học loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh	11
1.1.7. Một số yếu tố liên quan đến mật độ xương và loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh.....	12
1.2. Gen và loãng xương.....	15
1.2.1. Tổng quan về gen <i>MTHFR</i> và SNP rs1801133	17
1.2.2. Tổng quan về gen <i>LRP5</i> và SNP rs41494349.....	25
1.2.3. Tổng quan về gen <i>FTO</i> và SNP 1121980.....	30
1.3. Các kỹ thuật sinh học phân tử phân tích gen	34
1.3.1. Kỹ thuật PCR.....	34
1.3.2. Phương pháp ARMS-PCR	35
1.3.3. Kỹ thuật RFLP-PCR.....	36
1.3.4. Kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp	36
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	38
2.1.1. Địa điểm nghiên cứu.....	38
2.1.2. Thời gian nghiên cứu:.....	38
2.2. Đối tượng nghiên cứu	38
2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn:.....	38
2.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ:.....	39

2.3. Phương pháp nghiên cứu	39
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu	39
2.3.2. Cỡ mẫu	39
2.3.3. Phương pháp chọn mẫu.....	40
2.3.4. Quy trình phỏng vấn và khám lâm sàng	41
2.3.5. Đo BMD theo phương pháp hấp thụ tia X năng lượng kép	43
2.3.6. Quy trình lấy máu phân tích gen và bảo quản	46
2.3.7. Các bước tiến hành phân tích gen	47
2.4. Các biến số nghiên cứu.....	57
2.5. Sơ đồ nghiên cứu.....	58
2.6. Sai số và không chế sai số.	59
2.7. Phân tích và xử lý số liệu.....	59
2.8. Đạo đức nghiên cứu.....	60
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	62
3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu	62
3.2. Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của đối tượng nghiên cứu	66
3.2.1. Nồng độ DNA và độ tinh sạch trung bình	66
3.2.2. Kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133	67
3.2.3. Kiểu gen và alen của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349.....	68
3.2.4. Kiểu gen và alen của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980	70
3.2.5. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm không loãng xương.....	72
3.2.6. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường.....	73

3.3. Mối liên quan giữa tính đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 với mật độ xương và các yếu tố nguy cơ loãng xương.....	76
3.3.1. Mối liên quan giữa kiểu gen và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	76
3.3.2. Mối liên quan giữa kiểu gen và các yếu tố nguy cơ loãng xương ...	77
3.3.3. Tương quan 2 biến của một số yếu tố nguy cơ với mật độ xương	80
3.3.4. Tương quan đa biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương và mật độ xương	81
3.3.5. Tương quan tuyến tính đơn biến của các đa hình gen với mật độ xương.....	82
3.3.6. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.....	85
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	94
4.1 Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu	94
4.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu	94
4.1.2. Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	95
4.1.3. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu theo phân loại mật độ xương	96
4.2. Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133.....	100
4.2.1. Bàn luận về phân bố tần số alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133.....	101
4.2.2. Bàn luận về phân bố kiểu gen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133.....	102

4.2.3. Bàn luận về sự phân bố tần số alen của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349.....	102
4.2.4. Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349.....	103
4.2.5. Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980.....	104
4.2.6. Bàn luận về phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương.....	105
4.2.7. Bàn luận về phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng	106
4.3. Mối liên quan giữa tính đa hình của một số gen với mật độ xương và một số yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh	107
4.3.1. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133 với mật độ xương.	107
4.3.2. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349 với mật độ xương.	108
4.3.3. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980 với mật độ xương.	109
4.3.4. Tương quan tuyến tính đơn biến và đa biến giữa một số yếu tố nguy cơ với mật độ xương.....	110
4.3.5. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 với mật độ xương	110

4.3.6. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 với mật độ xương	111
4.3.7. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 với mật độ xương	111
4.3.8. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.	112
4.3.9. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.....	119
4.3.10. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.	121
KẾT LUẬN	126
KHUYẾN NGHỊ	128
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1:	Giá trị mật độ xương đỉnh (pBMD) (g/cm ²) và tuổi đạt đỉnh ở người Việt Nam.....	5
Bảng 1.2:	So sánh mật độ xương (g/cm ²) của người Việt với các nước Châu Á khác và người da trắng.....	5
Bảng 2.1:	Mật độ xương đỉnh trung bình (g/cm ²) trong quần thể của phụ nữ Việt Nam đo bằng máy Hologic ⁴	46
Bảng 2.2:	Các biến số nghiên cứu.....	57
Bảng 3.1:	Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.....	62
Bảng 3.2:	Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu theo phân nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương.....	65
Bảng 3.3:	Nồng độ DNA và độ tinh sạch trung bình.....	66
Bảng 3.4:	Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 của đối tượng nghiên cứu.....	68
Bảng 3.5:	Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 của đối tượng nghiên cứu.....	69
Bảng 3.6:	Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 của đối tượng nghiên cứu.....	71
Bảng 3.7:	Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm không loãng xương.....	72
Bảng 3.8:	Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cổ xương đùi.....	73
Bảng 3.9:	Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí đầu trên xương đùi.....	74

Bảng 3.10. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cột sống thắt lưng	75
Bảng 3.11. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	76
Bảng 3.12. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	76
Bảng 3.13. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	77
Bảng 3.14. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và các yếu tố nguy cơ loãng xương	77
Bảng 3.15. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349 và các yếu tố nguy cơ loãng xương	78
Bảng 3.16. Mối liên quan giữa kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980 và các yếu tố nguy cơ loãng xương	79
Bảng 3.17. Tương quan tuyến tính đơn biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương với mật độ xương.....	80
Bảng 3.18. Tương quan đa biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương và mật độ xương.....	81
Bảng 3.19. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 với mật độ xương	82
Bảng 3.20. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 với mật độ xương	83
Bảng 3.21. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 với mật độ xương	84

Bảng 3.22.	Tương quan đa biến giữa đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cổ xương đùi.....	85
Bảng 3.23.	Tương quan đa biến giữa đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại đầu trên xương đùi.....	86
Bảng 3.24.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cột sống thắt lưng....	87
Bảng 3.25.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cổ xương đùi.....	88
Bảng 3.26.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại đầu trên xương đùi..	89
Bảng 3.27.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cột sống thắt lưng....	90
Bảng 3.28.	Tương quan đa biến giữa đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại 3 vị trí.....	91
Bảng 3.29.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí	92
Bảng 3.30.	Tương quan đa biến giữa các đa hình gen <i>MTHFR</i> rs1801133, <i>LRP5</i> rs41494349, <i>FTO</i> rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí	93
Bảng 4.1.	So sánh tần số alen và kiểu gen của đa hình gen <i>FTO</i> rs1121980 với các nghiên cứu khác.....	104
Bảng 4.2.	Hàm lượng folat trong 100 gam phần ăn được của một số thực phẩm	119

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1: Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu.....	63
Biểu đồ 3.2: Phân bố tỉ lệ loãng xương của đối tượng nghiên cứu	64
Biểu đồ 3.3: Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu theo phân nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương	66
Biểu đồ 4.1. Tần số alen C và T của đa hình <i>MTHFR</i> rs1801133 ở một số cộng đồng.....	101
Biểu đồ 4.2. Sự phân bố kiểu gen của đa hình <i>MTHFR</i> rs 1801133 ở một số cộng đồng.....	102
Biểu đồ 4.3. Tần số alen A và G của gen <i>LRP5</i> rs41494349 ở một số cộng đồng.	103
Biểu đồ 4.4. Sự phân bố kiểu gen của đa hình gen <i>LRP5</i> rs41494349 ở một số cộng đồng	103

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Mô xương bình thường và mô xương bị loãng xương.....	3
Hình 1.2:	Quá trình tái mô hình.....	7
Hình 1.3:	Vị trí gen <i>MTHFR</i> trên NST 1	17
Hình 1.4:	Chu trình chuyển hóa folat.....	18
Hình 1.5:	Ảnh hưởng của gen <i>MTHFR</i> đến xương.....	20
Hình 1.6:	Vị trí gen <i>LRP5</i>	25
Hình 1.7:	Sơ đồ protein <i>LRP5</i> và vị trí các exon.....	25
Hình 1.8:	Sơ đồ đường tín hiệu Wnt/ β -catenin.....	28
Hình 1.9:	Vị trí và cấu trúc gen <i>FTO</i> trên nhiễm sắc thể.....	30
Hình 1.10:	Cấu trúc protein <i>FTO</i>	32
Hình 3.1:	Kết quả xác định kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133 bằng phương pháp ARMS-PCR	67
Hình 3.2:	Kết quả xác định kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133 bằng phương pháp giải trình tự gen.....	67
Hình 3.3:	Kết quả xác định kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349 bằng phương pháp RFLP-PCR	68
Hình 3.4:	Xác định kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349 bằng phương pháp giải trình tự gen	69
Hình 3.5:	Kết quả xác định kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980 bằng phương pháp RFLP-PCR.....	70
Hình 3.6:	Kết quả xác định kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980 bằng phương pháp giải trình tự gen.....	70
Hình 4.1:	Quá trình chuyển hóa acid folic và folat.....	117
Hình 4.2:	Quá trình chuyển hóa Homocystein	118

ĐẶT VẤN ĐỀ

Loãng xương là một bệnh phổ biến ảnh hưởng đến khoảng 200 triệu người trên thế giới đặc trưng bởi giảm mật độ xương (Bone Mineral Density - BMD), tổn thương vi cấu trúc xương, gia tăng tính dễ gãy của xương¹. Năm 2021, một phân tích tổng hợp của Nader Salari và cộng sự bao gồm 70 nghiên cứu trên 800.457 phụ nữ tuổi từ 15 đến 105, tỷ lệ loãng xương ở phụ nữ trên thế giới là 23,1%, tỷ lệ loãng xương ở phụ nữ châu Âu là 19,8%, châu Mỹ là 15,1%, châu Á là 24,3%². Tỷ lệ loãng xương cao kéo theo chi phí điều trị loãng xương và gãy xương tăng gây ảnh hưởng đáng kể về kinh tế, xã hội và gánh nặng lâm sàng. Ở Hoa Kỳ, chi phí hàng năm để điều trị gãy xương do loãng xương là 17 tỷ đô la¹. Phụ nữ sau mãn kinh là đối tượng có nguy cơ cao bị loãng xương. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Hồ Phạm Thục Lan cho thấy tỉ lệ loãng xương cổ xương đùi (CXĐ) ở phụ nữ sau mãn kinh thành phố Hồ Chí Minh là 28,6%³. Theo Nguyễn Thị Thanh Hương tỉ lệ loãng xương CXĐ và cột sống thắt lưng (CSTL) ở phụ nữ miền Bắc lần lượt là 23,1% và 49,5%⁴.

Loãng xương là một bệnh lý chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố trong đó yếu tố gen đóng vai trò quan trọng. Nghiên cứu trên các cặp sinh đôi và phả hệ cho thấy 50-85% sự biến đổi BMD là do gen qui định⁵. Đến nay có hơn 20 nghiên cứu toàn hệ gen (genome wide association studies)(GWAS) được công bố và GWAS lớn nhất cho đến năm 2019 là của Morris và cộng sự đã xác định 518 locus ảnh hưởng đến BMD⁶. Trong điều kiện Việt nam khi chưa thực hiện được nghiên cứu toàn hệ gen, chúng tôi chọn 3 đa hình gen ứng viên để nghiên cứu là *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 và *FTO* rs1121980 vì trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa 3 đa hình gen này với BMD và các kết quả này được lặp lại ở nhiều chủng tộc trên thế giới. Nhiều nghiên cứu cho thấy người mang alen T của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ bị giảm BMD như nghiên cứu của tác giả Bo Abrahamsen trên phụ nữ sau mãn kinh Đan Mạch⁷, Xiumei Hong trên phụ nữ sau mãn kinh Trung Quốc⁸, Masataka Shiraki trên phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản⁹. Sự có mặt của alen T làm giảm hoạt động của enzym

MTHFR (Methylen Tetrahydrofolat Reductase) dẫn đến tăng nồng độ homocystein máu có nguy cơ làm giảm BMD¹⁰. Một điều thú vị là mặc dù không can thiệp được trên gen này, song nếu tác động để đạt được sự bình thường của nồng độ homocystein máu, sẽ bảo vệ được BMD của những phụ nữ mãn kinh mang gen này.

Gen *LRP5* (LDL Receptor Related Protein 5) liên quan đến con đường tín hiệu Wnt/ β -catenin ảnh hưởng đến tế bào tạo xương và BMD. Đa hình gen *LRP5* rs41494349 (Q89R) rất hiếm gặp ở người da trắng nhưng lại tương đối hay gặp ở người châu Á¹¹. Nghiên cứu của các tác giả Tomohiko Urano, Jung-Min Koh, Zhen- lin ZANG trên người Nhật Bản, Hàn Quốc và Trung Quốc đều cho kết quả người mang alen R của đa hình gen Q89R có BMD thấp hơn người không mang alen R^{11,12,13}. Gen *FTO* (Fat mass and Obesity Associated) ảnh hưởng đến trực yếu tố tăng trưởng biệt hóa 11 (growth differentiation factor 11) và gamma thụ thể kích hoạt chất tăng sinh peroxisome (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) gọi tắt là GDF11-FTO-PPAR γ liên quan đến sự biệt hóa dòng tế bào gốc trung mô sang tế bào mỡ và ức chế sự hình thành xương, dẫn đến sự mất cân bằng giữa khối lượng xương và chất béo¹⁴. Nghiên cứu của Bích Trần và cộng sự (2013) trên người Úc cho kết quả phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử lặn TT của SNP rs1121980 có nguy cơ gãy CXĐ cao hơn 2,06 lần so với nhóm phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử trội CC¹⁵. Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào tìm hiểu mối liên quan của 3 đa hình gen trên với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu tính đa hình của một số gen ở phụ nữ loãng xương sau mãn kinh**” với hai mục tiêu:

1. **Xác định tính đa hình của gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở phụ nữ loãng xương sau mãn kinh**
2. **Tìm hiểu mối liên quan giữa tính đa hình của gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 với mật độ xương và một số yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh.**

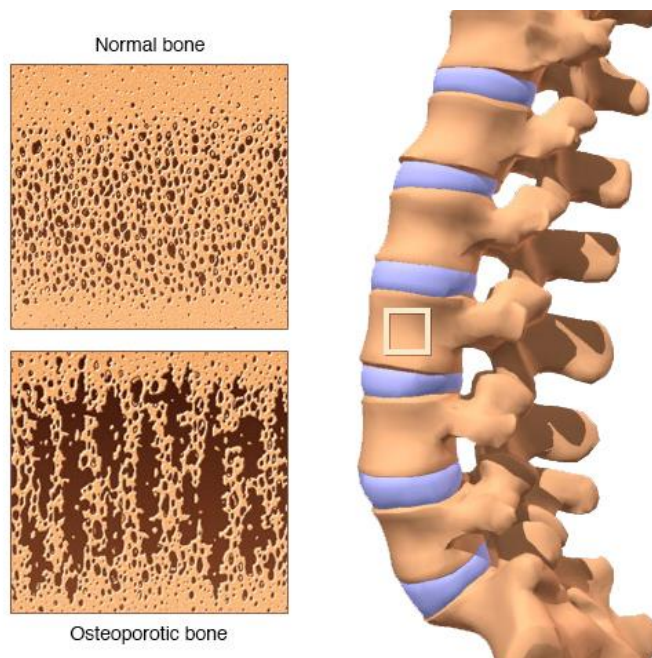
CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan loãng xương và loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh

1.1.1. Định nghĩa loãng xương

Định nghĩa của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 1994: loãng xương là một bệnh lý của xương, được đặc trưng bởi sự giảm khối lượng xương kèm theo hư tổn cấu trúc của xương, dẫn đến tăng tính dễ gãy của xương, tức là có nguy cơ gãy xương. Do vậy, cần đo mật độ xương để đánh giá nguy cơ gãy xương¹⁶. Định nghĩa này đã được WHO sửa đổi năm 2001, loãng xương được đặc trưng bởi sự thay đổi sức mạnh của xương. Sức mạnh này được đặc trưng bởi mật độ xương và chất lượng xương. Chất lượng xương được đánh giá bởi các thông số: cấu trúc của xương, chu chuyển xương, độ khoáng hóa, tổn thương tích lũy, tính chất của các chất cơ bản của xương. Trong các thông số này, chu chuyển xương đóng một vai trò quan trọng¹⁶.



Hình 1.1: Mô xương bình thường và mô xương bị loãng xương

(Nguồn <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/osteoporosis/symptoms>)

1.1.2 Chẩn đoán loãng xương

Hiện nay, phương pháp tốt nhất để chẩn đoán loãng xương là đo mật độ khoáng xương bằng phương pháp hấp thụ tia X năng lượng kép (DXA). Mật độ xương là lượng chất khoáng của xương được chia cho diện tích vùng được khảo sát, tính bằng gram/cm². Để chẩn đoán loãng xương, BMD của một cá nhân được so với giá trị BMD trung bình của quần thể trong độ tuổi 20 - 40 (BMD đỉnh)¹⁷. Chỉ số T (T_{score}) là số độ lệch chuẩn (SD) của BMD hiện tại với BMD đỉnh. Một người được chẩn đoán loãng xương nếu chỉ số T là -2,5 hoặc thấp hơn, giảm mật độ xương nếu chỉ số T từ -2,5 đến -1,0, mật độ xương bình thường nếu chỉ số T là -1,0 trở lên. BMD thấp là yếu tố nguy cơ quan trọng nhất của gãy xương. Giảm 1 SD sẽ làm tăng nguy cơ gãy xương khoảng 2-3 lần¹⁸. Do đó, điều cần thiết là phải có được số liệu BMD và chỉ số T chính xác.

Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo cổ xương đùi là vùng giải phẫu quan trọng nhất để chẩn đoán loãng xương. Tuy nhiên, hướng dẫn của Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng (ISCD) và Hội loãng xương Hoa Kỳ (NOF) khuyến cáo rằng chẩn đoán loãng xương nên dựa trên ba vị trí là cổ xương đùi, đầu trên xương đùi và cột sống thắt lưng. Phép đo tại các vị trí khác nhau này có thể đưa ra các kết quả khác nhau.

Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng khuyến cáo rằng nên sử dụng một nhóm tham chiếu nữ trẻ tuổi để tính chỉ số T cho cả nam và nữ¹⁹. Tuy nhiên, Hội loãng xương Hoa Kỳ cho rằng nên sử dụng giá trị nhóm tham chiếu trẻ cùng giới để chẩn đoán loãng xương. Phụ nữ có mức BMD thấp hơn nam giới và BMD bị ảnh hưởng bởi các yếu tố di truyền và môi trường⁴. Do đó, điều quan trọng là phải có các giá trị tham chiếu cụ thể về dân tộc và giới tính để có được chẩn đoán chính xác.

Bảng 1.1: Giá trị mật độ xương đỉnh (pBMD) (g/cm^2) và tuổi đạt đỉnh ở người Việt Nam⁴

Vị trí	pBMD	pBMD (với Lunar)	pBMD (với Hologic)	Tuổi đạt pBMD
Nữ				
Cổ xương đùi		0,94 (0,11)	0,80(0,10)	25
Đầu trên xương đùi		1,02 (0,12)	0,86(0,10)	32
Cột sống thắt lưng		1,16 (0,13)	0,98(0,11)	30
Nam				
Cổ xương đùi		-	0,85(0,11)	25
Đầu trên xương đùi		-	0,91(0,12)	30
Cột sống thắt lưng		-	0,97(0,11)	32

Theo số liệu nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hương và cộng sự năm 2012 (bảng 1) cho thấy giá trị mật độ xương đỉnh ở phụ nữ Việt nam thấp hơn nam giới Việt Nam, giá trị mật độ xương đỉnh đo trên máy Hologic thấp hơn máy Lunar

Bảng 1.2: So sánh mật độ xương (g/cm^2) của người Việt với các nước Châu Á khác và người da trắng⁴

pBMD ở cổ xương đùi ($X \pm SD$)(đo trên máy Hologic)		
Dân số	Phụ nữ	Đàn ông
Người Việt ở miền Bắc	0,80 \pm 0,10	0,85 \pm 0,11
Người Việt ở thành phố Hồ Chí Minh	0,80 \pm 0,11	0,85 \pm 0,13
Người Nhật	0,83 \pm 0,12	-
Người Trung Quốc	0,81 \pm 0,12	0,94 \pm 0,15
Người Mỹ da trắng	0,86 \pm 0,12	0,93 \pm 0,14

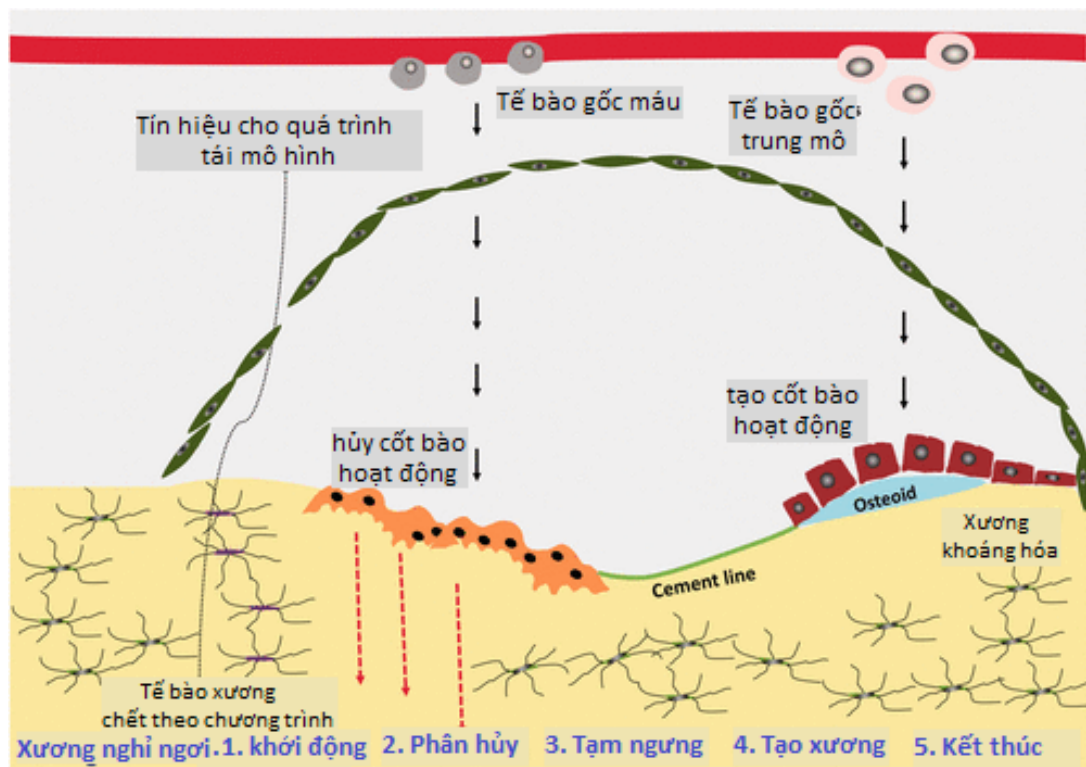
Số liệu nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hương và cộng sự năm 2012 (bảng 2) cho thấy giá trị mật độ xương đỉnh tại cổ xương đùi đo bằng máy Hologic ở Việt Nam là tương đương giữa miền Nam và miền Bắc. Tuy nhiên, giá trị này thấp hơn người Trung Quốc và người Mỹ da trắng.

Trong đề tài này, chúng tôi tính chỉ số T tại 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng. Chúng tôi lấy giá trị tham chiếu pBMD của phụ nữ miền Bắc Việt Nam trong độ tuổi 20 – 40, giá trị BMD đo bằng máy Hologic. Điều này đảm bảo chỉ số T của chúng tôi được tính chính xác vì giá trị BMD của đối tượng nghiên cứu được so với pBMD của người cùng chủng tộc, cùng giới và được sử dụng cùng loại máy đo mật độ xương là máy Hologic.

1.1.3. Sinh lý học quá trình phát triển xương

Trong quá trình phát triển của xương trải qua hai quá trình mô hình (modelling) và tái mô hình (remodelling)²⁰. Mô hình hay còn gọi là chu chuyển xương lúc nhỏ, tái mô hình còn gọi là chu chuyển xương khi trưởng thành. Hai quá trình này xảy ra với những cơ chế khác nhau để biệt hóa các nhóm tế bào xương giúp đạt được sự tạo thành xương và hoặc làm mới xương. Trong giai đoạn mô hình, quá trình hủy xương diễn ra một cách độc lập với quá trình tạo xương. Mô hình xương diễn ra trên bề mặt xương ảnh hưởng đến kích thước và hình dạng của xương. Trong giai đoạn mô hình, mật độ xương gia tăng đến mức tối đa. Quá trình mô hình dừng lại ở độ tuổi 18 - 20, trước khi trưởng thành. Khác với giai đoạn mô hình, trong giai đoạn tái mô hình quá trình hủy xương và tạo xương diễn ra song song. Quá trình tái mô hình ảnh hưởng đến mật độ, độ khoáng hóa và vi cấu trúc của mô xương. Quá trình tái mô hình diễn ra liên tục (suốt đời), 25% lượng xương xốp và 5% lượng xương đặc có thể được thay đổi trong vòng một năm²¹. Quá trình tái mô hình xương (hình 1.2) xảy ra theo trình tự: khởi động (activation), phân hủy (resorption), tạm ngưng (reversal), tạo xương

(formation) và kết thúc (termination). Bước khởi động tùy thuộc vào các tế bào tạo xương hoặc là trên bề mặt của xương hoặc là trong tủy xương, gửi tín hiệu đến các tế bào gốc tạo máu (HSCs) để hình thành tế bào hủy xương. Bước phân hủy có thể xảy ra phía dưới các lớp tế bào liên kết. Sau một bước tạm ngưng ngắn ngủi, các tế bào tạo xương được biệt hóa từ tế bào gốc trung mô (MSCs) bắt đầu tạo ra những lớp xương mới. Một số các tế bào tạo xương còn lại trong xương được chuyển hóa thành tế bào xương, các tế bào này liên kết với nhau và với các tế bào tạo xương khác. Khi giai đoạn tạo xương trên hoàn tất, xương có khoảng thời gian bất động (quiescence). Giai đoạn phân hủy kéo dài vài tuần, nhưng giai đoạn tạo xương thì cần đến vài tháng để hoàn tất^{20,21}.



Hình 1.2: Quá trình tái mô hình

Nguồn: Kenkre JS, Bassett J(2018)²⁰

Các tế bào tham gia trong quá trình tái mô hình xương:

- Tế bào hủy xương (Osteoclast): xuất phát từ tế bào tạo máu, là tế bào duy nhất trong cơ thể có khả năng phân hủy cả chất căn bản canxi vô cơ và collagen hữu cơ²¹.

- Tế bào tạo xương (Osteoblast): xuất phát từ tế bào gốc trung mô, tác động đến sự thay đổi cấu trúc của xương.

- Tế bào xương (Osteocyte): xuất phát từ tế bào gốc trung mô, sự xuất hiện của nó liên quan đến cả hoạt động của tế bào hủy xương và tế bào tạo xương.

- Tế bào liên kết: thường có hình dạng phẳng và nằm trên mặt xương²¹.

1.1.4. Định nghĩa mãn kinh

Mãn kinh là hiện tượng sinh lý bình thường của người phụ nữ xảy ra khi nồng độ estrogen giảm, là tình trạng hết hẳn kinh nguyệt vĩnh viễn do sự suy giảm sinh lý, tự nhiên và không hồi phục của hoạt động buồng trứng.

Hiện tượng mãn kinh là tình trạng vô kinh ở người phụ nữ trong ít nhất 12 tháng liên tục²². Mãn kinh bình thường xảy ra ở lứa tuổi 45-55. Gọi là mãn kinh sớm nếu mãn kinh xảy ra lúc 40-45 tuổi, gọi là mãn kinh rất sớm nếu xảy ra trước tuổi 40²³.

1.1.5. Ảnh hưởng của mãn kinh đến loãng xương

Ảnh hưởng của mãn kinh đến loãng xương thông qua ảnh hưởng của hormon sinh dục. Hormon sinh dục (bao gồm estrogen và testosterone) đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo xương ở cả nam và nữ²⁴.

Estrogen tác động đến quá trình chuyển hóa xương thông qua nhiều cơ chế ảnh hưởng tế bào tạo xương, tế bào hủy xương, tế bào xương và các tế bào khác để duy trì mật độ khoáng của xương²⁵. Tác động của estrogen đến xương là qua thụ thể estrogen (estrogen receptor, ER)^{26,27}. Thứ nhất, estrogen có tác dụng ức chế các cytokin như interleukin-1, interleukin-6, interleukin-7 và TNF-alpha trong tế bào tạo xương. Sự ức chế các cytokin này có tác dụng

thúc đẩy làm tăng khối lượng xương. Thứ 2, estrogen gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào hủy xương. Estrogen thông qua hoạt hóa thụ thể estrogen alpha ($ER\alpha$) gây ra sự phiên mã của yếu tố Fas Ligand (FasL) trong tế bào xương. FasL được tách khỏi bề mặt tế bào và FasL hòa tan gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào hủy xương²⁸. Cơ chế thứ 3 của sự ức chế hủy cốt bào qua trung gian estrogen liên quan đến việc điều chỉnh tỷ lệ RANKL/OPG (Receptor activation of nuclear factor kappa B ligand/Osteoprotegerin). Các nghiên cứu trên invitro và invivo đã chỉ ra estrogen ức chế RANKL và tăng sản xuất OPG từ tế bào tạo xương.

Testosterone kích thích sự tăng trưởng của cơ, tác động tích cực đến quá trình tạo xương. Testosterone còn sản sinh ra estrogen trong quá trình tác động đến cơ và xương. Hiện nay, các chuyên gia đều đồng ý rằng testosterone chẳng những đóng vai trò quan trọng trong sức khỏe xương ở nam giới mà còn ở nữ giới²¹. Năm 2004, Vanderschueren và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu trên chuột được điều trị bằng dihydrotestosteron (là một loại testosteron không có khả năng chuyển thành estrogen thông qua quá trình aromatization) đã cho kết quả làm tăng tạo xương. Như vậy, kết quả nghiên cứu này đã củng cố cho tác dụng trực tiếp của testosteron lên xương²⁹.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hương và cộng sự năm 2014 cho thấy sự thay đổi của nồng độ estrogen và testosteron huyết thanh toàn phần của nam, nữ người Việt tuổi từ 13-83. Ở phụ nữ, nồng độ estrogen tương đối hằng định trước tuổi 40, sau đó giảm rõ rệt trong giai đoạn mãn kinh từ 40-60 tuổi, sau tuổi 60 thì đạt giá trị hằng định thấp. Trong khi nồng độ testosteron toàn phần giảm dần theo tuổi, xung quanh tuổi 50 nồng độ testosteron chỉ bằng $\frac{1}{2}$ so với tuổi 20. Đồng thời nghiên cứu này cũng cho thấy hai hormon sinh dục này đều có liên quan với BMD ở cả nam và nữ giới³⁰.

Trong giai đoạn mãn kinh nồng độ hormon estrogen và testosterone giảm dẫn đến sự mất cân bằng của quá trình tái mô hình do việc kéo dài giai đoạn hủy xương với sự gia tăng tuổi thọ của các hủy cốt bào và rút ngắn giai đoạn tạo xương bằng cách thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào tạo xương³¹. Những thay đổi này dẫn đến các tế bào tạo xương không còn đủ khả năng để lấp đầy các chỗ trống do tế bào hủy xương tạo ra. Hơn nữa, kéo dài tuổi thọ tế bào hủy xương làm tăng chiều sâu sự hủy xương và dẫn đến việc loại bỏ cấu trúc mạng lưới bên trong xương xốp³². Đồng thời, sự thâm nhập sâu hơn của hủy cốt bào ở bề mặt nội cốt dẫn đến sự hao hụt và làm mỏng vỏ xương³³. Quá trình hủy xương tăng 90% sau mãn kinh trong khi đó quá trình tạo xương chỉ khoảng 45%, đánh giá dựa trên các marker của quá trình tạo xương³⁴. Tính trung bình, phụ nữ mất khoảng 50% xương xốp và 35% xương đặc trong quãng đời. Nhưng chưa ai biết bao nhiêu phần trăm của sự mất xương này là do thiếu hay suy giảm hormon sinh dục và bao nhiêu là do các yếu tố liên quan đến sự lão hóa hay các yếu tố môi trường. Tuy nhiên có ước tính cho rằng khoảng 25% xương xốp và 15% xương đặc bị mất là do suy giảm hoặc thiếu hormon sinh dục. Ngay thời điểm hay sau thời kỳ mãn kinh, estrogen bị suy giảm và hệ quả là mật độ xương cũng suy giảm nhanh chóng nhất là trong 5 năm đầu sau mãn kinh²¹. Thêm vào đó là quá trình già hóa nên chức năng của tế bào tạo xương giảm, sự hấp thu canxi tại ruột và tổng hợp vitamin D kém đi làm ảnh hưởng xấu đến mật độ xương. Mãn kinh là nguyên nhân quan trọng nhất gây loãng xương. Tuy nhiên không phải người phụ nữ nào ở tuổi mãn kinh cũng bị loãng xương mà chỉ có khoảng 30% số người bị loãng xương và ở độ tuổi ngoài 75 thì tỉ lệ này chiếm tới 40 - 60%³⁵.

1.1.6. Dịch tễ học loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh

Theo thống kê của WHO đến năm 2050 trên thế giới có 21% dân số bị loãng xương, trong số đó 51% ở các nước Châu Á^{36,37,38}. Hầu hết các trường hợp loãng xương xảy ra ở phụ nữ sau mãn kinh, tỉ lệ này tăng lên theo tuổi. Tại Mỹ năm 2009 có 13 - 18% phụ nữ da trắng trên 50 tuổi bị loãng xương ở vị trí cổ xương đùi, 37 - 50% bị giảm mật độ xương. Tỉ lệ loãng xương ở nhóm phụ nữ 50 - 59 tuổi là 14% và tăng lên 52% ở nhóm phụ nữ trên 80 tuổi³⁸. Tại Thái Lan, tỉ lệ loãng xương dựa trên kết quả đo mật độ xương bằng phương pháp DXA là 13,6% ở vị trí cổ xương đùi, 19,6% ở vị trí cột sống thắt lưng và tỉ lệ loãng xương cũng tăng theo tuổi, tuổi càng cao thì tỷ lệ loãng xương càng tăng, phụ nữ dưới 45 tuổi tỉ lệ loãng xương là 2%, phụ nữ trên 75 tuổi tỉ lệ loãng xương là 60%, tỉ lệ loãng xương của phụ nữ sau mãn kinh xấp xỉ 30%³⁹. Tại Việt Nam, nghiên cứu của các tác giả ở hai miền Bắc, Nam đã cho thấy tỉ lệ loãng xương ở cả nam và nữ cao tương đương với người da trắng và cao hơn hẳn một số nước ở Đông Á. Theo số liệu của Nguyễn Thị Thanh Hương tại Hà Nội (năm 2009) nghiên cứu trên 328 phụ nữ tuổi từ 13-80 bằng máy DXA cho thấy tỉ lệ loãng xương tại CXĐ I

à 23,1%, tại CSTL là 49,5%⁴. Nghiên cứu của tác giả Hồ Phạm Thục Lan tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2011 trên 870 phụ nữ tuổi từ 18-89 cho thấy tỉ lệ loãng xương của phụ nữ tuổi từ 50 trở lên tại CXĐ là 28,6%³. Nghiên cứu của tác giả Marquez và cộng sự năm 2009 ở phụ nữ mãn kinh người Mỹ gốc Việt cũng cho thấy tỉ lệ loãng xương là 37%⁴⁰. Như vậy, chúng ta có thể thấy rằng loãng xương thực sự là một vấn đề nghiêm trọng tại Việt Nam. Loãng xương thường tiến triển âm thầm, không có triệu chứng và phần lớn chỉ chẩn đoán sau khi có biểu hiện gãy xương trên lâm sàng. Do vậy, việc xác định sớm các yếu tố nguy cơ loãng xương để dự phòng là vô cùng cần thiết.

1.1.7. Một số yếu tố liên quan đến mật độ xương và loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh

- Tuổi:

Tỷ lệ loãng xương tăng theo tuổi do ở người già có sự mất cân bằng giữa quá trình tạo xương và hủy xương. Chức năng của tạo cốt bào bị suy giảm làm cho quá trình hủy xương nhanh hơn tạo xương là một nguyên nhân dẫn tới tình trạng mất xương ở người già. Bên cạnh đó, giảm hấp thu calci ở ruột và giảm tái hấp thu calci ở ống thận cũng là nguyên nhân gây giảm BMD. Hơn nữa, người già thường ăn ít hơn, hoạt động thể lực ít hơn, ít tiếp xúc với ánh nắng mặt trời hơn⁴¹. Tất cả lý do trên dẫn đến BMD giảm theo tuổi và tỷ lệ gãy xương tăng theo tuổi. Một nghiên cứu của Kruger và cộng sự năm 2016 về loãng xương ở 7 quốc gia châu Á (Singapor, Đài loan, Thái lan, Việt nam, Malaysia, Indonesia, Philippine) đã chứng minh chỉ số Tscore giảm đáng kể theo tuổi, hơn 50% phụ nữ trên 55 tuổi bị giảm mật độ xương và loãng xương, đến năm 70 tuổi hơn một nửa bị bệnh loãng xương⁴².

- Yếu tố chiều cao, cân nặng, chỉ số BMI:

Các chỉ số nhân trắc như chiều cao, cân nặng, BMI cũng là những yếu tố gây ảnh hưởng tới BMD. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sự liên quan giữa chỉ số BMI với BMD⁴³. BMI thấp là yếu tố nguy cơ giảm BMD⁴⁴, người nhẹ cân có BMI thấp nguy cơ loãng xương cao hơn, những người có chiều cao thấp cũng có nguy cơ loãng xương cao hơn so với người khác. Nghiên cứu của tác giả Yuzhang Tao và cộng sự trên 204 phụ nữ sau mãn kinh Trung Quốc cho thấy nhóm phụ nữ không loãng xương có chỉ số BMI cao hơn nhóm phụ nữ loãng xương ($p < 0,05$)⁴⁵.

- Tuổi mãn kinh và thời gian mãn kinh:

Phụ nữ mãn kinh sớm có nguy cơ loãng xương cao hơn nhóm chưa mãn kinh do thiếu hụt hormon estrogen. Tốc độ mất xương ở phụ nữ sau mãn kinh

cao hơn ở nam giới cùng tuổi, tốc độ này là 0,5 - 1,5%/ năm, thậm chí lên tới 7 - 10%/năm, trong khi của nam giới là 0,4%/năm. Tốc độ mất xương nhanh bắt đầu từ 2 - 3 năm trước mãn kinh và kéo dài các năm sau đó do nồng độ hormon estrogen giảm, làm ảnh hưởng tới chu chuyển xương dẫn tới tăng tốc độ mất xương và tăng tỉ lệ loãng xương^{46,47}. Nghiên cứu của Dương Thanh Bình năm 2018 tại Bệnh viện Hữu nghị Việt nam – Cu ba Đồng Hới cho thấy số năm sau mãn kinh càng dài thì BMD càng giảm⁴⁸.

- Yếu tố sinh đẻ:

Nhiều nghiên cứu cho thấy phụ nữ không sinh đẻ là yếu tố nguy cơ loãng xương vì khi có thai làm tăng ảnh hưởng và hoạt động của hormon giới tính. Bên cạnh đó, những phụ nữ không cho con bú có nguy cơ loãng xương cao hơn những phụ nữ cho con bú vì sự tiết sữa có tác dụng kích thích chuyển hoá xương.

Những phụ nữ sinh nhiều con có nguy cơ bị loãng xương cao hơn^{41,49}, do không bổ sung đầy đủ calci, vitamin D khi mang thai và cho con bú. Một giả thuyết được đặt ra là khi sinh nhiều con sẽ ảnh hưởng đến chuyển hoá calci của người mẹ vì có thai ảnh hưởng đến thăng bằng nội môi hệ thống xương của người mẹ, calci từ mẹ sẽ hấp thu vào hệ thống xương của thai nhi. Bởi vậy, nếu người phụ nữ sinh nhiều lần mà không được bổ sung đầy đủ calci và vitamin D cho cơ thể thì sẽ có nguy cơ loãng xương cao hơn. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Lành và cộng sự trên phụ nữ đã mãn kinh đến khám tại Bệnh viện Đa khoa Hậu Giang cho kết quả số lần sinh con có tương quan nghịch với mật độ xương ($r = -0,52, p < 0,001$)⁵⁰.

- Yếu tố dinh dưỡng:

Dinh dưỡng ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe của bộ xương. Xương được cấu tạo bởi protein và các chất khoáng trong đó chủ yếu là calci và phospho. Canxi và vitamin D là yếu tố cấu thành cần thiết để phát triển và duy trì sự ổn

định hệ thống xương khoẻ mạnh^{51,52}. Khi tình trạng thiếu vitamin D và cân bằng canxi âm kéo dài dẫn tới tăng tốc độ huỷ xương, tăng nguy cơ loãng xương và gãy xương⁵³.

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy mối liên quan giữa mức độ thu nhận protein và khối lượng xương. Theo Rizzoli và cs (2001) thiếu protein làm cơ yếu đi không đủ sức chống đỡ khi gặp nguy cơ té ngã, các cơ không đủ đệm cho xương và không đủ sức căng để giúp xương chịu lực ở những nơi bị loãng. Những ảnh hưởng của sự thiếu hụt protein này có thể gián tiếp qua hệ thống kích thích tăng trưởng.

Một số thực phẩm có chứa hàm lượng canxi cao như: sữa, hải sản, phô mát, sữa chua, trứng, đậu tương, rau xanh...

- Yếu tố lối sống:

+ Một số thói quen có nguy cơ làm giảm mật độ xương: thói quen hút thuốc lá, lạm dụng rượu, uống cà phê. Lạm dụng rượu làm giảm hấp thu calci ở ruột đồng thời các chất độc sinh ra khi chuyển hóa ngăn cản hoạt động của tạo cốt bào

+ Thời gian tiếp xúc với ánh nắng mặt trời: quyết định việc kích thích da tổng hợp vitamin D, một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hấp thụ canxi của cơ thể.

+ Hoạt động thể lực giúp tăng khối lượng xương ở tuổi thiếu niên để đạt đến mật độ xương đỉnh khi trưởng thành và giúp giảm nguy cơ mất chất khoáng trong xương làm giảm mật độ xương dẫn đến loãng xương và gãy xương ở người cao tuổi⁵⁴. Hơn nữa vận động còn giúp tăng sức mạnh của cơ và giảm nguy cơ té ngã. Nghiên cứu phân tích tổng hợp của Melanie Kistler-Fischbacher và cộng sự cho thấy tập thể dục cường độ vừa phải làm tăng BMD tại đầu trên xương đùi⁵⁵.

- Yếu tố bệnh lý:

+ Bệnh lý về nội tiết: đái tháo đường; cường giáp, cường cận giáp, suy giáp, suy giảm tuyến sinh dục ở cả nam và nữ, mãn kinh sớm, cắt buồng trứng hoặc cắt tinh hoàn hai bên.

+ Bất động lâu sau chấn thương.

+ Sau cắt dạ dày ruột, bệnh viêm dạ dày ruột, Crohn's, viêm loét đại tràng.

+ Rối loạn tiêu hoá kéo dài.

+ Suy thận, xơ gan.

+ Viêm khớp mãn tính: viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp, bệnh lý cơ.

- **Các yếu tố khác:** sử dụng thuốc glucocorticoid, các hoá chất chống ung thư, thuốc chống đông, thuốc động kinh, thuốc trung hoà acid dạ dày ...

1.2. Gen và loãng xương

- Ngoài các yếu tố ảnh hưởng tới loãng xương đã được biết đến từ lâu như: tuổi, tình trạng hormon, các yếu tố về lối sống (thói quen ăn uống, tập luyện) và yếu tố gia đình. Gần đây sự phát triển của công nghệ gen với khả năng phân tích và xác định các dạng đa hình kiểu gen có ảnh hưởng tới bệnh loãng xương và gãy xương đã mở ra một kỉ nguyên mới trong nghiên cứu về xương nói riêng và y học nói chung. Các nghiên cứu trên các cặp song sinh cùng trứng cho thấy yếu tố di truyền đóng vai trò quan trọng với bệnh loãng xương, quyết định 50-85% mật độ xương⁵⁶.

- Xương không chỉ nâng đỡ cơ thể và bảo vệ các cơ quan nội tạng mà còn có chức năng trao đổi chất đặc biệt là duy trì sự cân bằng chất khoáng trong cơ thể. Mô xương luôn ở trạng thái cân bằng giữa quá trình hủy xương và tạo xương. Khi quá trình hủy xương vượt quá quá trình tạo xương, quá trình mất xương sẽ xảy ra dẫn đến giảm mật độ xương và loãng xương. Cơ chế bệnh sinh đề cập đến tất cả các con đường điều hòa di truyền ảnh hưởng

đến sự biểu hiện gen mà không làm thay đổi trình tự DNA bao gồm methyl hóa DNA, sửa đổi histone, tái cấu trúc nhiễm sắc thể và RNA không mã hóa đóng vai trò quan trọng trong nhiều bệnh bao gồm cả bệnh loãng xương. Nghiên cứu sâu về các cơ chế bệnh sinh này sẽ giúp hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh của quá trình chuyển hóa xương bất thường và loãng xương⁵⁷.

- Các gen có thể ảnh hưởng đến mật độ xương được nghiên cứu trên thế giới là các gen liên quan đến hệ thống tín hiệu RANKL/RANK/OPG, thụ thể LRP5/LRP6 (những thụ thể kiểm soát lipid), con đường tín hiệu Wnt (Wnt signalling pathway), gen liên quan tới thụ thể estrogen (ER1, ER2), gen liên quan tới thụ thể vitamin D (VDR), gen liên quan tới mạng lưới collagen (COL1A1, COL1A2). Các nghiên cứu di truyền liên quan đến loãng xương bắt đầu vào khoảng những năm 1990. Ban đầu là những nghiên cứu đơn gen như khiếm khuyết gen COL1A1 và COL1A2 gây bệnh xương dễ gãy, đột biến gen *LRP5* gây hội chứng OPGG (osteoporosis pseudoglioma)⁵⁸. Hai nghiên cứu toàn hệ gen được công bố đầu tiên năm 2008 đã xác định được 5 locus ảnh hưởng đến mật độ xương. Đến nay có hơn 20 GWAS được công bố và GWAS lớn nhất cho đến năm 2018 là của Morris và cộng sự đã xác định 518 locus ảnh hưởng đến BMD⁶.

- Trong đề tài này chúng tôi chọn 3 đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 và *FTO* rs1121980 vì trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa 3 đa hình kiểu gen này với mật độ xương và các kết quả này được lặp lại ở nhiều chủng tộc châu Âu, châu Á, châu Úc. Hoạt động của gen *MTHFR* liên quan đến nồng độ homocystein máu ảnh hưởng đến chuyển hóa của xương. Gen *LRP5* liên quan đến con đường tín hiệu Wnt/ β -catenin có ảnh hưởng đến tế bào tạo xương và quy định khối lượng xương.. Gen *FTO* đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu có mối liên quan mạnh với bệnh đái tháo đường và béo phì nên có khả năng ảnh hưởng tới bệnh

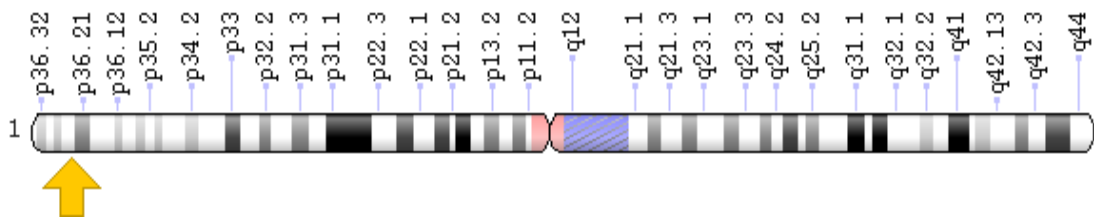
loãng xương. Gen *FTO* ảnh hưởng đến trục GDF11-FTO-PPAR γ liên quan đến sự biệt hóa dòng tế bào gốc trung mô sang tế bào mỡ và ức chế sự hình thành xương.

1.2.1. Tổng quan về gen *MTHFR* và SNP *rs1801133*

MTHFR là một gen qui định protein enzym. Có nhiều bệnh liên quan đến gen *MTHFR* như: loãng xương, bệnh tim mạch, dị tật ống thần kinh, bệnh tâm thần, ung thư đại tràng, ung thư máu, ung thư tuyến giáp, đái tháo đường typ 2, xảy thai liên tiếp. Hoạt động của gen liên quan đến nồng độ homocystein máu, đặc biệt là nồng độ folat huyết thanh⁵⁹.

1.2.1.1. Vị trí và cấu trúc của gen *MTHFR*

Gen *MTHFR* nằm trên nhánh ngắn p của nhiễm sắc thể số 1 (1p36.3), bắt đầu từ cặp base 1944 từ đầu p và kết thúc ở cặp base 27374. Tổng cộng có 25431 cặp base. Gen *MTHFR* bao gồm 11 exon và 11 introns.



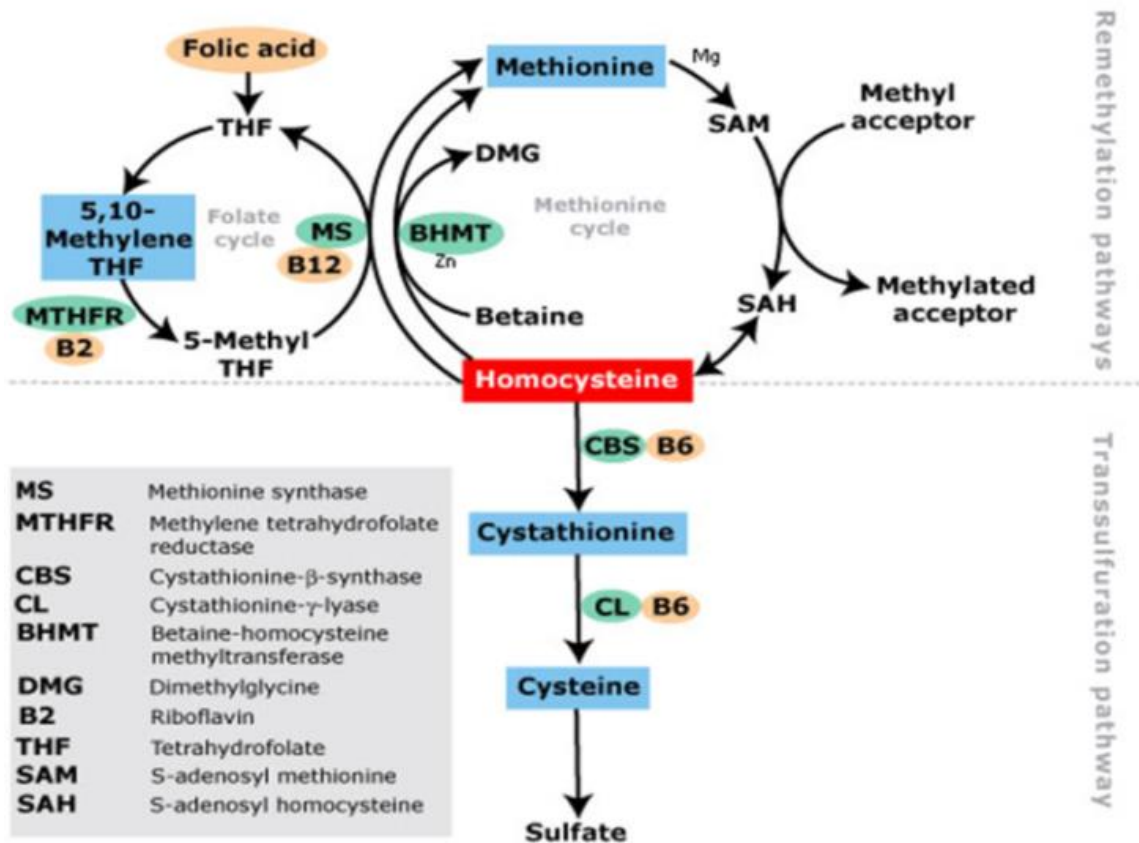
Hình 1.3. Vị trí gen *MTHFR* trên NST 1

Nguồn: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>

1.2.1.2. Enzym *MTHFR*

Methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) là một trong những enzyme quan trọng nhất trong chu trình chuyển hóa folat (hình 1.4). Trong chu trình chuyển hóa folat enzym *MTHFR* chuyển 5,10 methylenetetrahydrofolate (*CH₂THF*) thành 5-methyltetrahydrofolate (*CH₃THF*), 5-MTHF được sử dụng để biến đổi homocysteine thành methionin (Met) dưới sự xúc tác của enzyme methionine synthase (MS) methionin được cơ thể sử dụng để tổng hợp ra protein và nhiều hợp chất quan trọng⁶⁰. Hoạt động bình thường của

enzym MTHFR sẽ duy trì tính ổn định của vòng chuyển hóa folate và ngăn chặn nguy cơ tăng nồng độ Homocysteine trong máu. Sự giảm hoạt tính enzyme MTHFR do gen MTHFR C677T ảnh hưởng tới quá trình chuyển hóa folat gây tăng nồng độ homocystein máu và dẫn tới nhiều tình trạng bệnh lý trong đó có loãng xương.



Hình 1.4. Chu trình chuyển hóa folat

Nguồn: Goyette P và cs (1995)⁶¹

1.2.1.3. Đa hình gen MTHFR

- Hiện nay khoảng 50 điểm đa hình trên gen MTHFR đã được tìm thấy trong đó hai đa hình MTHFR hay gặp đó là MTHFR rs1801133 (C677T) và MTHFR A1298C, cả hai đều làm giảm hoạt tính của enzym MTHFR và dẫn tới tăng nồng độ homocystein máu.

- Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có tính ảnh hưởng lớn tới hoạt tính enzyme MTHFR so với các đa hình khác của gen *MTHFR*⁶².

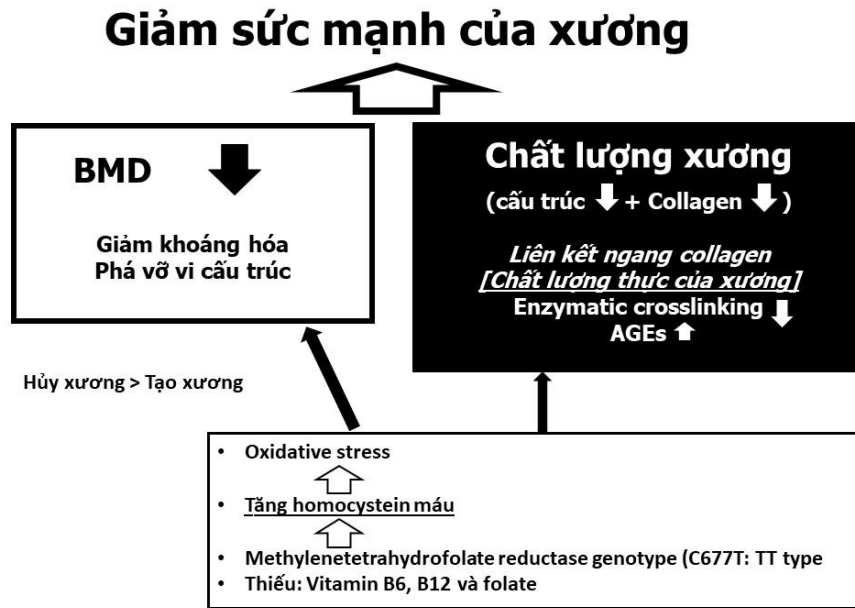
- Trong nghiên cứu này chúng tôi xem xét tới đa hình kiểu gen *MTHFR* rs1801133 (*MTHFR* C677T), nucleotid C biến đổi thành T ở vị trí số 677 làm biến đổi valin ở vị trí 222 thành alanin⁶³.

1.2.1.4. SNP rs1801133 - C677T - Ala222Val

- Đa hình gen *MTHFR* rs1801133 (*MTHFR* C677T) sẽ làm giảm hoạt tính của enzyme MTHFR. Những người mang gen *MTHFR* C677T ở dạng đồng hợp tử lặn (*MTHFR* 677TT) thì enzyme hoạt động ít hơn 70% so với bình thường (*MTHFR* 677CC) còn ở dạng dị hợp tử (*MTHFR* 677CT) thì enzym hoạt động ít hơn 30 - 40% so với bình thường (*MTHFR* 677CC)^{10,64}. Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng người mang kiểu gen đồng hợp tử TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có yếu tố nguy cơ của nhiều bệnh lý như loãng xương, tim mạch, đột quỵ, tăng huyết áp, tiền sản giật, tăng nhãn áp, rối loạn tâm thần, và một số loại ung thư.

1.2.1.5. Cơ chế gây loãng xương của gen *MTHFR*

Gen *MTHFR* C677T làm thay đổi hoặc giảm hoạt động của enzyme methylene tetrahydrofolate reductase, dẫn đến sự tăng nồng độ homocystein trong máu. Cơ chế mà nồng độ homocystein tăng trong máu có thể ảnh hưởng đến mật độ xương và bệnh loãng xương có thể do nhiều yếu tố và các yếu tố này tương tác với nhau⁶⁵. Homocysteine tăng làm tăng hoạt động của tế bào hủy xương, giảm hoạt động của tế bào tạo xương và tác động trực tiếp đến chất nền xương⁶⁶ (hình 1.5).



Hình 1.5. Ảnh hưởng của gen MTHFR đến xương

Nguồn: Saito M, Marumo K (2018)⁶⁷

- Các nghiên cứu trong ống nghiệm cho thấy mức homocystein cao có thể điều chỉnh quá trình tái mô hình xương bằng cách thúc đẩy hoạt động của tế bào hủy xương, gây ra quá trình chết theo chương trình ở tế bào mô đệm, tế bào xương, tế bào tạo xương và ức chế biệt hóa nguyên bào nuôi. Homocystein gây ra quá trình chết theo chương trình thông qua hoạt động của các loại oxy phản ứng và NF-kappa B (nuclear factor kappaB). Các loại oxy phản ứng nội bào kích thích hoạt động tế bào hủy xương, đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng hủy xương. Sự mất cân bằng giữa quá trình tạo xương và hủy xương này có thể gây ra BMD thấp những người tăng homocystein máu⁶⁷.
- Roman Thaler và cộng sự (2011) chứng minh rằng homocystein kích thích tổng hợp interleukin 6 (IL-6), có thể điều chỉnh sự phát triển và biệt hóa của tế bào hủy xương dẫn đến tăng tiêu xương, điều này giải thích chu chuyển xương cao ở một số bệnh nhân có nồng độ homocystein huyết

thanh cao. Hơn nữa, homocystein ức chế hoạt động của enzym tạo liên kết ngang collagen lysyl oxidase (Lox) (nguyên nhân là do ức chế mRNA tương ứng với enzym), nó làm giảm biểu hiện enzym Lox thông qua IL-6, JAK2, Fli1 (yếu tố phiên mã Friend leukemia integration 1) dẫn đến giảm chất lượng chất nền xương⁶⁸.

- Các nhóm thiol trong homocystein trải qua quá trình tự động oxy hóa do đó gây ra stress oxy hóa và tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS). Ứng suất oxy hóa sau đó gây ra sự tổng hợp các metalloproteinase nền. Họ metalloproteinase nền bao gồm 3 phân nhóm chính collagenase kẽ, gelatinase, stromelysins tham gia vào quá trình thoái hóa chất nền ngoại bào và tái tạo xương. Cả 2 loại collagenase và gelatinase ảnh hưởng đến collagen của xương bởi nguyên bào xương⁶⁹.
- Một trong những cơ chế được đề xuất mà homocystein ảnh hưởng đến xương tiếp theo là homocystein máu tăng sẽ làm giảm lưu lượng máu trong xương. Nghiên cứu của Thomas Vacek và cộng sự năm 2012 thấy rằng lưu lượng máu đến xương chày bị giảm ở những con chuột có nồng độ homocystein máu cao. Lưu lượng máu đến xương rất quan trọng vì xương là mô sống bao gồm các tế bào cần chất dinh dưỡng để duy trì và phát triển. Giảm lưu lượng máu đến xương có thể là một nguyên nhân dẫn tới loãng xương⁶⁶.

1.2.1.6. Các nghiên cứu về *MTHFR rs1801133* tương quan với mật độ xương

- Bo Abrahamsen và cộng sự (2003) nghiên cứu trên 1748 phụ nữ Đan Mạch mãn kinh chỉ ra người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR rs1801133* bị giảm mật độ xương tại CSTL, CXĐ, ĐTXĐ so với người mang kiểu gen CC và TT ở giai đoạn sớm sau mãn kinh. Sau 5 năm điều trị liệu pháp hormon thay thế thì người mang kiểu gen TT vẫn bị giảm mật độ xương tại vị trí đầu trên xương đùi⁷.

- Robert R. McLean và cộng sự (2004) nghiên cứu 1632 đối tượng gồm cả nam và nữ (Nghiên cứu Framingham Offspring được tiến hành trên cư dân thị trấn Framingham, bang Massachusetts, Mỹ). Những người tham gia được định lượng về nồng độ folate trong huyết tương và xác định tính đa hình *MTHFR* rs1801133. Kết quả xác định có mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TT của *MTHFR* rs1801133 và mật độ xương phụ thuộc vào nồng độ folat huyết thanh. Người mang kiểu gen TT có mật độ xương thấp hơn người không mang kiểu gen TT⁷⁰.
- Morten M. Villadsen và cộng sự (2004) nghiên cứu trên 724 đối tượng gồm 388 bệnh nhân loãng xương và 336 đối chứng đã cho thấy kiểu gen TT của *MTHFR* rs1801133 làm tăng nguy cơ gãy xương và là một yếu tố dự báo nguy cơ giảm BMD tại cột sống thắt lưng ở phụ nữ Đan mạch⁷¹.
- Xiumei Hong và cộng sự (2007) nghiên cứu trên 1899 phụ nữ sau mãn kinh Trung Quốc cho thấy người mang alen T của đa hình *MTHFR* rs1801133 có xu hướng loãng xương cao hơn người không mang alen T nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê⁸.
- Zhu và cộng sự (2008) thực hiện một nghiên cứu thuần tập trên 1213 phụ nữ Australia có tuổi từ 70 đến 85 đã tìm thấy mối liên hệ giữa nồng độ homocystein máu cao do đa hình gen *MTHFR* rs1801133 gây giảm mật độ xương đùi nhưng không làm tăng nguy cơ gãy xương⁷².
- Masataka Shiraki và cộng sự (2008) nghiên cứu trên 502 phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản cho thấy người mang kiểu gen TT có tỷ lệ mắc bệnh loãng xương và gãy xương cao hơn người không mang kiểu gen TT⁹.
- Agueda và cộng sự (2010) nghiên cứu trên 944 phụ nữ sau mãn kinh Tây Ban Nha cho thấy đa hình gen *MTHFR* rs1801133 không liên quan một cách có ý nghĩa thống kê với mật độ xương cổ xương đùi và cột sống thắt lưng tuy nhiên tác giả lại thấy rằng kiểu gen dị hợp tử 677TT *MTHFR* gây tăng nguy cơ gãy xương đốt sống⁷³.

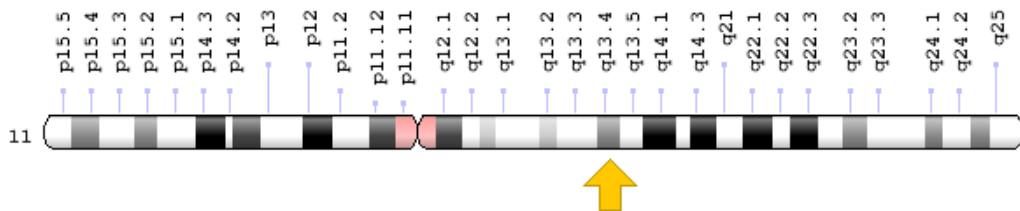
- Wang và cộng sự (2011) phân tích 20 nghiên cứu với 3525 bệnh nhân và 17909 đối tượng thuộc nhóm chứng cho thấy sự tương quan mức độ nhẹ giữa *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương CXĐ, CSTL, ĐTXĐ và toàn bộ cơ thể ở người Đông Á⁷⁴.
- Năm 2012, Aniel Jessica Leticia Brambila – Jabia và cộng sự nghiên cứu trên 71 bệnh nhân viêm khớp dạng thấp Mexico cho kết quả những người có kiểu gen đồng hợp tử TT có BMD thấp hơn những người có kiểu gen dị hợp tử CT và cả 2 nhóm này có BMD thấp hơn những người có kiểu gen đồng hợp tử CC⁷⁵.
- Năm 2013, Chutaporn Tongboonchoo và cộng sự nghiên cứu trên 346 phụ nữ sau mãn kinh Thái Lan cho thấy những người có kiểu gen dị hợp tử CT có nguy cơ giảm mật độ xương cao hơn kiểu gen CC⁷⁶.
- Năm 2016, Hong – Zhuo Li và cộng sự phân tích tổng hợp 21 nghiên cứu trên 33045 đối tượng cho thấy đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có liên quan với BMD cổ xương đùi ở phụ nữ sau mãn kinh, ở người da trắng và ở nam giới. Khi phân tích tổng hợp 22 nghiên cứu trên 32271 đối tượng nhóm tác giả cũng cho thấy có sự liên quan giữa đa hình gen này với BMD cột sống thắt lưng ở phụ nữ sau mãn kinh⁷⁷.
- Năm 2020, Xiao-Chen và cộng sự đã tổng hợp 7 nghiên cứu bệnh chứng trên phụ nữ Trung Quốc, Mexico và Thái Lan, tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 với nguy cơ loãng xương. Kết quả chỉ ra rằng những người có alen T đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh loãng xương trong mô hình đồng trội kiểu gen TT so với kiểu gen CC (OR = 2,36, 95%CI: 1,81 – 3,08, p<0,05), mô hình trội kiểu gen TT và CT so với kiểu gen CC (OR=1,47, 95%CI: 1,21 – 1,77, p<0,05), mô hình lặn kiểu gen TT so với kiểu gen CC và CT (OR = 2,16, 95%CI: 1,71 – 2,74, p<0,05)⁷⁸.

- Năm 2020, Massimo De martinis và cộng sự nghiên cứu trên 252 Phụ nữ sau mãn kinh Italia cho thấy có mối liên quan đáng kể giữa nồng độ homocystein, BMD và interleukin 6 trong bệnh loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh⁶⁵.
- Năm 2021 Nakamo và cộng sự đã quan sát thấy mối liên hệ đáng kể của *LRP5* rs3736228 và *MTHFR* rs1801133 với tỷ lệ viêm khớp gối, viêm khớp háng và loãng xương ở phụ nữ cao tuổi Nhật Bản từ nhóm nghiên cứu được chọn mẫu ngẫu nhiên⁷⁹.
- Năm 2014, Guan và cộng sự phân tích 7 nghiên cứu bệnh chứng với 4258 bệnh nhân và 3454 người khỏe mạnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự liên quan giữa đa hình *MTHFR* rs1801133 với gãy xương do loãng xương ở phụ nữ mãn kinh⁸⁰.
- Năm 2019 Soewarlan W.D.H.P và cộng sự nghiên cứu trên đối tượng phụ nữ sau mãn kinh Indonesia không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 và BMD⁸¹.
- Tổng hợp lại, chúng tôi thấy có rất nhiều nghiên cứu cho thấy người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ bị giảm mật độ xương như nghiên cứu của tác giả Bo Abrahamsen trên phụ nữ sau mãn kinh Đan Mạch, Massimo De martinis trên phụ nữ sau mãn kinh Italia, Xiumei Hong trên phụ nữ sau mãn kinh Trung Quốc, Masataka Shiraki trên phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản. Tuy nhiên, nghiên cứu của Soewarlan W.D.H.P và cộng sự trên phụ nữ sau mãn kinh Indonesia, một đất nước cùng ở khu vực Đông Nam Á với Việt Nam lại chưa thấy mối liên quan giữa đa hình gen này và mật độ xương. Tại Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu nào về đa hình gen *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương và nguy cơ gãy xương ở phụ nữ mãn kinh.

1.2.2. Tổng quan về gen *LRP5* và SNP rs41494349

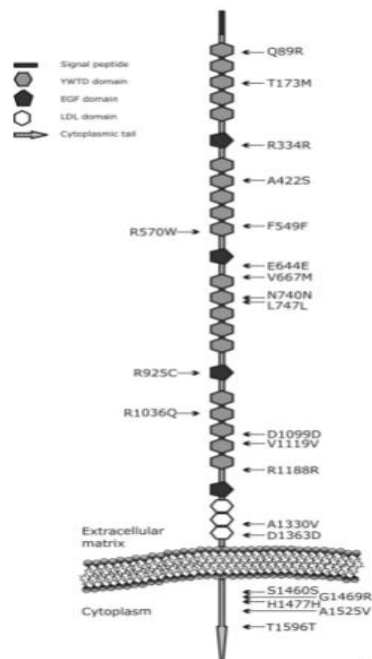
1.2.2.1. Vị trí và cấu trúc của gen *LRP5*

- Vùng di truyền học tế bào: 11q13.4 có nghĩa là gen nằm trên cánh dài (q) nhiễm sắc thể 11 tại vị trí 13.4, bắt đầu từ cặp base 68,298,865 đến cặp base 68,449,274. Bằng việc phân tích trình tự gen, Gong đã xác định được gen *LRP5* gồm 23 vùng mã hóa exon và trải dài 100kb với vùng ngoại bào lớn, vùng xuyên màng duy nhất và một đuôi tế bào chất⁸². Trong các mô xương, *LRP5* được tìm thấy trong các tế bào tạo xương và tế bào xương, nhưng không thấy trong hủy cốt bào⁸³.



Hình 1.6. Vị trí gen *LRP5*

- SNP Q89R (rs41494349) nằm tại vị trí exon 2, vùng mã hóa thứ 1 của protein *LRP5*. Tại SNP Q89R nucleotid A được thay bằng nucleotid G.



Hình 1.7: Sơ đồ protein *LRP5* và vị trí các exon.

Nguồn: Saarinen A (2011)⁸⁴

1.2.2.2. Lịch sử phát hiện gen *LRP5*

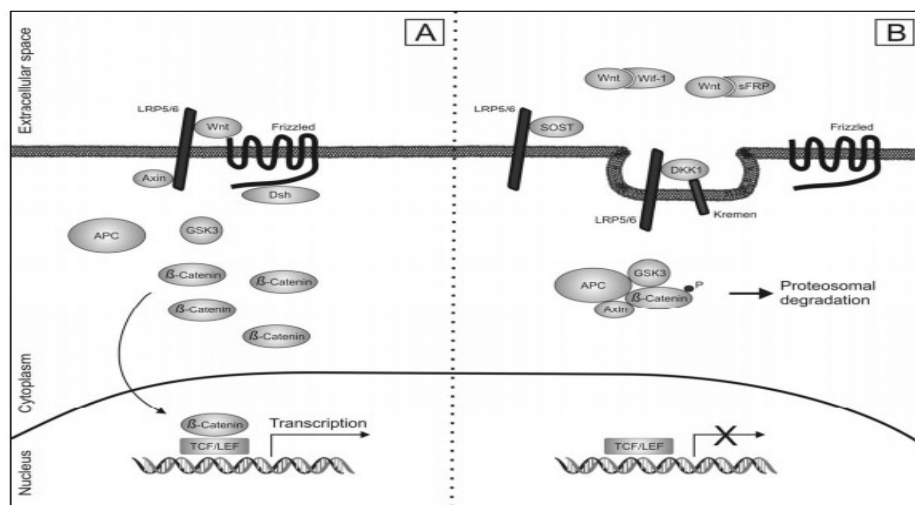
Cách đây khoảng 20 năm, nghiên cứu di truyền đã nhấn mạnh tầm quan trọng của gen *LRP5* trong việc điều chỉnh sự hình thành xương với việc xác định các đột biến gây bệnh ở những bệnh nhân có khối lượng xương thấp hoặc cao bất thường. Các nghiên cứu sau đó đã chứng minh rằng *LRP5* là đồng thụ thể của con đường truyền tín hiệu Wnt chuẩn, điều chỉnh sự tăng sinh và biệt hóa của tạo cốt bào cũng như quá trình chết theo chương trình của tế bào xương⁸⁵. Cụ thể hơn, đột biến mất chức năng trong gen *LRP5* có thể gây ra hội chứng OPPG⁸⁶, được đặc trưng bởi giảm khối lượng xương, tăng tính dễ gãy của xương và giảm thị lực nghiêm trọng. Cho đến nay, hơn 70 đột biến khác nhau trong gen *LRP5* đã được báo cáo là gây ra OPPG⁸⁷. Bên cạnh kiểu hình OPPG nghiêm trọng, có báo cáo rằng đột biến mất chức năng trong gen *LRP5* có thể gây ra chứng loãng xương khởi phát ở tuổi vị thành niên mà không có kiểu hình giảm thị lực mắt⁸⁸.

Bên cạnh đó, đột biến ở gen *LRP5* cũng có thể dẫn đến kiểu hình xương với khối lượng xương tăng lên⁸⁹. Các đột biến trong *LRP5* được xác định ở những bệnh nhân được chẩn đoán có kiểu hình khối lượng xương cao (HBM), chứng xơ xương đặc trưng bởi khối lượng xương tăng lên, đặc biệt ảnh hưởng đến xương sọ, xương ống và giảm nguy cơ gãy xương. Do khối lượng xương của hộp sọ tăng lên, đau đầu và chèn ép dây thần kinh sọ thường được báo cáo ở những bệnh nhân này⁹⁰. Những rối loạn này đều do đột biến tăng chức năng trong gen *LRP5*. Chúng phá vỡ sự liên kết của chất ức chế tín hiệu Wnt chuẩn, sclerostin và Dickkopf-1 (DKK1) với đồng thụ thể. Mặc dù các đột biến ở DKK1 không được báo cáo ở những bệnh nhân bị rối loạn xương đơn gen, nhưng các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng DKK1 là một chất điều hòa quan trọng đối với con đường tín hiệu Wnt và khối lượng xương thông qua sự tương tác của nó với *LRP5*. Kết quả là, các đột biến phá vỡ liên kết của *LRP5* với sclerostin và DKK1 dẫn đến tăng hoạt động tín hiệu Wnt chuẩn, do đó dẫn đến tăng hình thành xương⁸⁹.

1.2.2.3. Con đường tín hiệu Wnt và vai trò của gen LRP5

Đường tín hiệu Wnt là một trong những con đường tín hiệu được nghiên cứu rộng rãi nhất trong sinh học đã được công bố cách đây gần 30 năm. Đó là trọng tâm của các nghiên cứu về phôi, nghiên cứu ung thư, nghiên cứu tế bào và chuyển hóa xương. Đường tín hiệu Wnt được duy trì cao giữa các loài và nó điều chỉnh các chức năng của tế bào như sự phát triển của phôi thai, cân bằng nội môi, và biệt hóa tế bào⁹¹. Mặc dù chức năng trong nhiều lĩnh vực vẫn còn chưa rõ ràng, song vai trò quan trọng của nó trong chuyển hóa xương là không thể phủ nhận. Đường tín hiệu Wnt có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển xương và cân bằng nội môi của xương⁸⁹. Hiện tại có 4 con đường trong đó con đường Wnt/ β -catenin là được nghiên cứu nhiều nhất. Con đường này liên quan đến sự liên kết của Wnt với coreceptor của lipoprotein trọng lượng phân tử thấp liên quan với protein (the low-density lipoprotein receptor related proteins)- LRP5 hoặc LRP6 (ở động vật xương sống) và một thành viên của gia đình protein frizzled. Sự liên kết của Wnt với phức hợp coreceptor dẫn đến sự kích hoạt của protein nội bào, Dishevelled, và sự gắn của protein, Axin, với phần đuôi của LRP5 hoặc LRP6. Axin hoạt động như là một protein kết nối gắn với 1 vài protein thành phần của phức hợp thoái hóa giúp điều chỉnh nồng độ β -catenin trong tế bào. Thành viên chủ chốt của sự thoái hóa này là glycogensynthase kinase-3b(GSK-3b). Sự kích hoạt Dishevelled dẫn đến ức chế GSK-3b thông qua sự phosphoryl hóa serine 9. Bình thường chức năng của GSK-3b là phosphoryl hóa β -catenin. Sự gắn kết của Wnt và những con đường này trong xương và chức năng tế bào xương cho đến nay vẫn chưa được làm rõ. Tuy nhiên các protein Wnt khác nhau sẽ ưu tiên kích hoạt một trong bốn con đường tín hiệu. Sự gắn của Wnt và sự ức chế tiếp theo của GSK3b, sự kết hợp của axin với LRP5 hoặc 6 dẫn đến sự phá vỡ của các phức hợp thoái hóa (degradation) và sự tích lũy của β -catenin trong tế bào. Sau đó β -catenin có thể di chuyển vào trong nhân tế bào, ở đó nó sẽ gắn với các thành viên của tế bào T/lymphocyte elongation factor (TCF/Lef) family và làm thay đổi sự biểu hiện của gen^{92,93}.

Ảnh hưởng của con đường tín hiệu Wnt/ β -catenin đối với BMD được làm sáng tỏ bằng các cơ chế gây bệnh khối lượng xương cao như bệnh xơ xương, bệnh Van Buchem. Các gen gây ra những rối loạn này như *LRP4*, *LRP5* và *LRP6* đều liên quan đến con đường tín hiệu Wnt/ β -catenin và tất cả các đột biến được báo cáo dẫn đến tăng tín hiệu Wnt/ β -catenin. Ngoài các tình trạng tăng khối lượng xương, các đột biến trong *Wnt1*, một phối tử gây ra tín hiệu Wnt/ β -catenin và *LRP5* cũng có thể dẫn đến giảm hoạt động tín hiệu Wnt/ β -catenin và do đó giảm khối lượng xương⁸⁹.



Hình 1.8. Sơ đồ đường tín hiệu Wnt/ β -catenin

Nguồn: Saarinen A (2011)⁸⁴

- Sự kích hoạt con đường được thực hiện Wnt liên kết với Frizzled và LRP5/6. Điều này gây ra sự hoạt hóa của tế bào Dishevelled (DSH), lần lượt ức chế GSK3. β -catenin không còn bị phosphoryl hóa và vì thế ổn định, chuyển lên nhân tế bào- nơi nó gây ra phiên mã qua các dòng TCF/LEF của các yếu tố phiên mã
- Sự ức chế con đường được thực hiện bởi các protein liên kết ức chế LRP5/6 (*DKK1* và *SOST*) hoặc protein liên kết Wnt (*sFRPs* và *WIF-1*). Ví dụ, *DKK1* tương tác với LRP5/6 và Kremen sinh ra nhập bào (endocytosis), giúp ngăn chặn sự hình thành của phức hệ LRP5/6 -Wnt- Frizzled. Axin tập hợp các loại protein thúc đẩy quá trình phosphoryl hóa β -catenin, tạo điều kiện cho sự xuống cấp β -catenin và ức chế của đường chính.

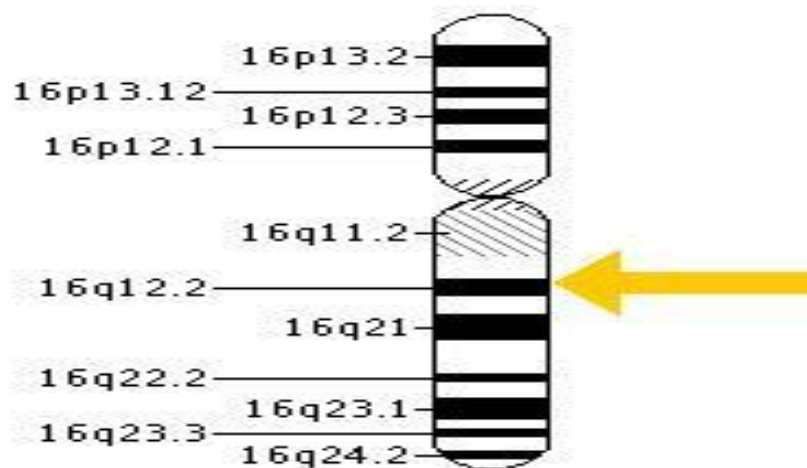
1.2.2.4. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* tại SNP rs41494349 và loãng xương.

- Tomohiko Urano và cộng sự (2006) nghiên cứu mối liên quan giữa *LRP5* rs41494349 với BMD ở 357 phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản nhận thấy những người có ít nhất 1 alen R có BMD cột sống thắt lưng thấp hơn những người không có alen R¹².
- Jung-Min Koh, Min Hui Jung và cộng sự (2003) nghiên cứu 219 nam 20-34 tuổi ở Hàn Quốc nhận thấy *LRP5* rs41494349 có liên quan đến BMD cổ xương đùi và tam giác Ward. Những người có alen R có BMD tại 2 vị trí này thấp hơn những người không có alen R¹¹.
- Zhen- lin ZANG và cộng sự (2005) nghiên cứu 647 phụ nữ mãn kinh Trung Quốc từ 43-76 tuổi nhận thấy rằng *LRP5* rs41494349 có liên quan đáng kể với BMD cổ xương đùi. Người mang kiểu gen Q89R QQ có BMD cổ xương đùi cao hơn người mang kiểu gen Q89R QR hoặc Q89R RR ($p < 0,05$)¹³.
- Anong Kitjaroenatham và cộng sự (2016) nghiên cứu trên 277 phụ nữ mãn kinh Thái Lan không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với BMD⁹⁴.
- Đa hình gen Q89R rất hiếm gặp ở người da trắng nhưng lại tương đối hay gặp ở người châu Á¹¹. Các nghiên cứu của các tác giả Tomohiko Urano, Jung-Min Koh, Zhen- lin ZANG trên người Nhật Bản, Hàn Quốc và Trung Quốc đều cho kết quả đồng thuận. Người mang alen R của đa hình gen Q89R có BMD thấp hơn người không mang alen R. Tuy nhiên, nghiên cứu trên phụ nữ sau mãn kinh Thái lan lại không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen này với mật độ xương.

1.2.3. Tổng quan về gen *FTO* và SNP 1121980

1.2.3.1. Vị trí và cấu trúc của gen *FTO*

Vị trí của gen được kí hiệu là 16q12.2 có nghĩa là gen nằm trên nhánh dài q của nhiễm sắc thể số 1 trong bộ gen người. *FTO* của người có chiều dài khoảng 400 kb, bao gồm 8 intron và 9 exon mã hóa nhiều sản phẩm protein. Các đa hình gen *FTO* rất tương đồng giữa các loài động vật có vú như chuột, lợn và các động vật có vú khác⁹⁵. Hầu hết các SNP (Single nucleotide polymorphism) trên gen *FTO* đã được phát hiện cho tới nay đều nằm ở vùng intron 1, đây là vùng intron lớn nhất của gen và trình tự có tính ổn định giữa các loài.



Hình 1.9. Vị trí và cấu trúc gen *FTO* trên nhiễm sắc thể

Nguồn: <http://ghr.nlm.nih.gov/gen/FTO>

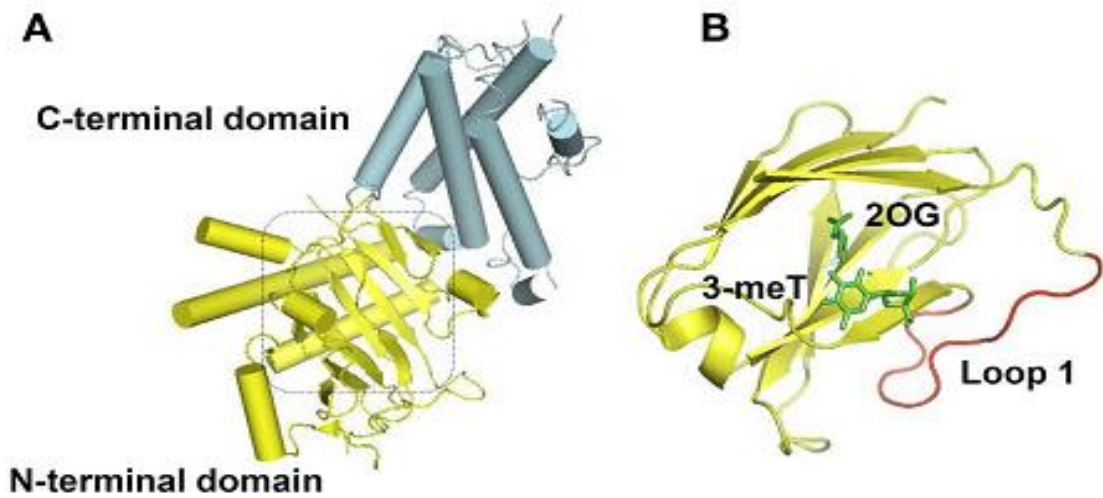
1.2.3.2. Lịch sử phát hiện gen *FTO*

Gen *FTO* được phát hiện từ năm 1999, là một trong sáu gen liên tiếp (ba thành viên của gia đình gen Iroquois: *Irx3*, *Irx5*, *Irx6* tạo thành các cụm *IrxB* và ba gen khác chưa rõ chức năng: *FTO*, *RPGRIP1L* và *FTS*⁹⁶. Gen *FTO* của người được biểu hiện trong nhiều mô bao gồm mạc treo, tuyến tụy, gan và mô mỡ, với nồng độ cao nhất được tìm thấy ở vùng dưới đồi⁹⁷. Có nhiều nghiên

cứu trên chuột đã chứng minh tác động trực tiếp của gen *FTO* đối với quá trình chuyển hóa. Fischer và cộng sự đã báo cáo rằng sự mất gen *FTO* ở chuột dẫn đến chậm phát triển sau khi sinh và giảm đáng kể mô mỡ và khối lượng nạc⁹⁸. Church et al. đã chỉ ra rằng đột biến gen *FTO* của chuột dẫn đến giảm khối lượng chất béo, tăng tiêu hao năng lượng mà không thay đổi hoạt động thể chất⁹⁹. Nghiên cứu gần đây của Gao và cộng sự đã phát hiện ra rằng gen *FTO* đóng một vai trò thiết yếu đối với sự phát triển sau khi sinh. Những con chuột thiếu gen *FTO* hoàn toàn có biểu hiện chậm phát triển sau khi sinh biểu hiện bằng trọng lượng và chiều dài cơ thể giảm, BMD thấp hơn¹⁰⁰. Sachse và cộng sự cho thấy gen *FTO* cần thiết cho sự phát triển bình thường của xương và quá trình khoáng hóa. Họ nhận thấy cả mật độ xương và hàm lượng khoáng chất trong xương đều giảm ở những con chuột loại trực tiếp gen *FTO*¹⁰¹. Các bằng chứng sinh học này gợi ý gen *FTO* có vai trò đối với mật độ xương và bệnh loãng xương ở người.

1.2.3.3. Protein *FTO*

Protein *FTO* ở người là một enzym nằm trong họ protein AlkB. Protein *FTO* có vai trò trong việc sửa chữa, cải biến phân tử acid nucleic vì gen *FTO* xúc tác phản ứng demethyl hóa 3-methylthymine ở chuỗi đơn ADN hoặc 3-uracilthymine trong chuỗi đơn ARN⁹⁵. Mặc dù vai trò và cơ chế ảnh hưởng chính xác của gen *FTO* đối với các quá trình sinh lý trong cơ thể vẫn chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên qua những nghiên cứu ở người và chuột người ta thấy gen *FTO* có vai trò rất quan trọng đối với sự phát triển bình thường của cơ thể bao gồm hệ xương, hệ thần kinh và tim mạch¹⁰².



Hình 1.10. Cấu trúc protein FTO

Nguồn: http://www.frontiersin.org/cellular_endocrinology/10.3389/fendo.2011.00004/full

1.2.3.4. Ảnh hưởng của protein FTO với bệnh loãng xương

Shen và cộng sự đã báo cáo rằng protein FTO ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thông qua cơ chế phụ thuộc vào yếu tố tăng trưởng biệt hóa 11 (growth differentiation factor 11) (GDF11)¹⁰³. Nồng độ GDF11 huyết thanh tăng có liên quan đến tỷ lệ loãng xương cao do kích thích hủy cốt bào và ức chế nguyên bào xương. Gamma thụ thể kích hoạt chất tăng sinh peroxisome (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (PPAR γ) thúc đẩy sự biệt hóa tế bào mỡ và ức chế sự biệt hóa nguyên bào xương từ tế bào gốc trung mô. Trục GDF11-FTO-PPAR γ đã thúc đẩy sự biệt hóa dòng tế bào gốc trung mô sang tế bào mỡ và ức chế sự hình thành xương, dẫn đến sự mất cân bằng giữa khối lượng xương và chất béo¹⁴.

1.2.3.5. Các nghiên cứu gen FTO với bệnh loãng xương

Năm 2011, Yan Guo và cộng sự đã lần đầu tiên thực hiện một nghiên cứu trên người để tìm hiểu mối liên quan giữa các SNP trên gen *FTO* với BMD. Trong tổng số 141 SNP được nghiên cứu đã phát hiện một nhóm gồm 6 SNP cùng nằm trên intron 8 của gen *FTO* (rs16952955, rs2540766, rs2540784, rs16952951, rs2447427, rs2689247) có mối liên quan một cách có ý nghĩa

thống kê với BMD cổ xương đùi ở 1627 người Trung Quốc được chia làm 2 nhóm ngẫu nhiên nhóm 1 gồm 818 người và nhóm 2 gồm 809 người. Cả 6 SNP này có tác dụng bảo vệ đối với BMD tại CXĐ, cụ thể mỗi alen phụ của mỗi SNP giúp BMD tại CXĐ tăng lên với hệ số β tương ứng là 0,025 ở nhóm 1 và 0,015 ở nhóm 2. Tuy nhiên, nghiên cứu này không tìm thấy mối liên quan giữa tính đa hình của các gen này với mật độ xương CXĐ ở 2268 người da trắng. Điều này được giải thích có thể do sự khác biệt về chủng tộc⁹⁷. Nghiên cứu đã mở ra một giả thuyết rằng gen *FTO* có thể là một ứng viên tiềm năng liên quan đến mật độ xương.

Tiếp theo, năm 2013 Bích Trần và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu phát hiện 6 SNP (rs1421085, rs1558902, rs1121980, rs17817449, rs9939609 và rs9930506) trên vùng intron 1 của gen *FTO* có mối liên quan với gãy xương ở người Úc da trắng ($p < 0,05$)¹⁵. Những người có kiểu gen đồng hợp tử TT của SNP rs1121980 có nguy cơ gãy CXĐ cao hơn 2,06 lần so với nhóm phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử CC (OR=2,06; CI 95%=1,17-3,62; $p=0,02$).

Nghiên cứu của Gaurav Garg và cộng sự (2014) tiến hành trên 5 SNP đã được chứng minh là có liên quan đến bệnh béo phì và loãng xương, bao gồm rs17782313, rs1770633 (gen *MCR4*), rs7566605 (gen *INSIG2*), rs 9939609 và rs1121980 (gen *FTO*) để đánh giá mối liên quan giữa các đa hình gen này với bệnh béo phì và BMD trên đối tượng là phụ nữ Thụy Điển, gồm hai nhóm OPRA với 1044 phụ nữ có độ tuổi trung bình là 75 và nhóm PEAK có độ tuổi trung bình là 25. Kết quả cả 2 SNPs (rs1121980 và rs9939609) của gen *FTO* đều không có mối liên quan đến BMD trong quần thể này¹⁰⁴.

Tuy SNP rs1121980 của gen *FTO* không có mối liên quan với BMD trên người Thụy Điển nhưng ở người Úc kiểu gen đồng hợp tử TT của SNP rs1121980 lại có nguy cơ gãy CXĐ cao hơn 2,06 lần so với nhóm phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử CC. Cho tới thời điểm hiện nay chưa có nghiên cứu nào

tại Đông Nam Á nói chung và Việt Nam nói riêng xem xét mối liên quan của gen *FTO* với loãng xương, đặc biệt là SNP rs1121980. Vì vậy, việc tiến hành nghiên cứu này trên người Việt Nam là cần thiết.

1.3. Các kỹ thuật sinh học phân tử phân tích gen

Với sự phát triển của sinh học phân tử, hiện nay có rất nhiều kỹ thuật để xác định kiểu gen. Một số kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu như kỹ thuật ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System – PCR: Kỹ thuật sử dụng hệ thống khuếch đại đột biến), RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR: Kỹ thuật xác định các loại chiều dài phân đoạn DNA của các đa hình gen bằng enzym cắt giới hạn), ASP-PCR (Allelen Specific-PCR: phản ứng khuếch đại chuỗi đặc hiệu alen), Real-Time multiplex PCR, giải trình tự gen trực tiếp (Sequencing).

1.3.1. Kỹ thuật PCR

PCR là phương pháp invitro để tổng hợp một trình tự xác định nhờ enzym. Phản ứng sử dụng 2 đoạn mỗi oligonucleotide gắn đặc hiệu với chuỗi bổ trợ và kéo dài chuỗi theo trình tự DNA đích cần khuếch đại nhờ enzym Taq DNA polymerase. PCR là 1 quá trình nhắc lại của 3 phản ứng liên tục:

- Biến tính DNA sợi kép thành DNA sợi đơn
- Gắn mỗi đặc hiệu chuỗi DNA sợi đơn tại đầu 5’-3’
- Kéo dài chuỗi nhờ hoạt tính enzym từ đầu 3’ theo hướng 3’ - 5’ để tổng hợp chuỗi DNA bổ trợ mới.

Ba bước này hợp thành 1 chu kỳ và sản phẩm mới vừa được tổng hợp lại có thể trở thành khuôn mẫu nên số lượng bản sao DNA đích gần như tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ, các chu kỳ nhắc lại sẽ làm tăng theo cấp số mũ số bản sao DNA đặc hiệu. Tuy nhiên, không phải hiệu quả khuếch đại của mọi phản ứng đều đạt 100% như lí thuyết. Chiều dài sản phẩm là tổng chiều dài của 2 đoạn mỗi và chiều dài khoảng cách giữa 2 đoạn mỗi của khuôn mẫu¹⁰⁵.

1.3.2. Phương pháp ARMS-PCR (Amplification refractory mutation system)

ARMS là một ứng dụng của PCR trong đó DNA được khuếch đại bằng các alen môi tương ứng đặc hiệu. ARMS - PCR là phương pháp rất hữu ích cho việc xác định các đột biến điểm hoặc đa hình. Nó cũng là phương pháp quan trọng để các định kiểu gen trong DNA là đồng hợp hay dị hợp. Dị hợp tử hoặc đồng hợp tử được phân biệt bằng cách sử dụng ARMS môi cho alen đột biến (Mutation) và bình thường (Wild type). Các phản ứng cho alen đột biến và các alen bình thường được thực hiện trong ống riêng biệt. Trong phương pháp này giếng 1 sử dụng cặp môi F (Forward primer) và Rw (Reverse wild type), giếng 2 sử dụng cặp môi F và Rm (Reverse mutation). Sự xuất hiện của sản phẩm đặc hiệu ở cả hai giếng là kiểu gen dị hợp tử, nếu chỉ xuất hiện ở giếng thứ 1 là đồng hợp tử bình thường, nếu chỉ xuất hiện ở giếng thứ 2 là đồng hợp tử đột biến.

Thiết kế môi:

Nguyên tắc chung của thiết kế môi PCR cũng được áp dụng với các cặp môi ARMS. Các ARMS – PCR đòi hỏi 1 cặp môi bao gồm 1 môi xuôi (F) và 1 môi ngược (Rw hoặc Rm). Môi ARMS có tính năng đặc biệt sau đây:

1. Các môi thông thường có chiều dài 20-30 base.
2. Các nucleotid ở đầu 3' của môi sẽ bổ sung với các nucleotid mục tiêu nghĩa là C – G, G – C, A – T, T – A. Sự không phù hợp ở vị trí này có thể làm giảm đáng kể khả năng khuếch đại, ví dụ 1 đa hình được thay thế C –T các nucleotid cuối cùng của môi ARMS cho alen bình thường là G (bổ sung cho C), cho alen đa hình lặn là A (bổ sung cho T).
3. Nếu thêm một điểm không bắt cặp ở 1 trong 5 nucleotid cuối cùng trong môi ARMS làm tăng thêm tính đặc hiệu cho phản ứng.
4. Có rất nhiều nguyên nhân gây ra sự âm tính giả ví dụ như quá ít hoặc quá nhiều DNA, chất lượng mẫu DNA kém, thất bại trong việc thêm môi, enzyme Taq, hoặc thuốc thử khác và sự xuất hiện của yếu tố ức chế PCR.

5. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng ARMS có thể kiểm soát được bởi các điều kiện phản ứng nghiêm ngặt, thiết kế môi tốt, và giới hạn số lượng các chu kỳ là rất quan trọng để tránh kết quả sai. Số lượng chu kỳ chỉ phải đủ để tạo ra một kết quả dương tính chắc chắn, việc tăng số lượng chu kỳ không cần thiết có thể gây ra kết quả dương tính giả¹⁰⁶.

1.3.3. Kỹ thuật RFLP-PCR

Kỹ thuật RFLP-PCR là phương pháp nghiên cứu tính đa hình chiều dài của các phân đoạn DNA dựa trên điểm cắt của các enzym giới hạn (Restriction Enzym, RE). Nói cách khác, đây là phương pháp so sánh DNA của các cá thể khác nhau sau khi cắt mẫu bằng một enzym giới hạn nhằm tìm hiểu xem có hay không đột biến điểm (mất hay xuất hiện một vị trí giới hạn mới) hoặc có hay không sự thay đổi một trình tự DNA. Nếu trình tự DNA của hai cá thể cùng loài hoàn toàn giống nhau về số lượng và kích thước thì sẽ có sự giống nhau về các băng DNA sau khi chạy điện di. Ngược lại nếu có sự xuất hiện đột biến điểm hoặc thay đổi một trình tự đoạn DNA trên sợi DNA thì sẽ có sự khác nhau về các băng DNA. Quá trình thực hiện kỹ thuật RFLP-PCR gồm các giai đoạn sau¹⁰⁷:

- Tiến hành phản ứng PCR với cặp môi thích hợp để khuếch đại đoạn DNA chứa SNP cần phân tích.
- Tiến hành phân cắt đoạn DNA này với một enzym giới hạn thích hợp.
- Điện di xác định sự khác nhau của các băng DNA và đưa ra kết luận.

1.3.4. Kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp

DNA là cơ sở của gen. Phân tử DNA là một chuỗi xoắn kép của hai mạch đơn được tạo thành từ 4 loại nucleotid khác nhau nhờ các base của chúng, đó là: A (Adenine), C (Cytosine), G (Guanine), T (Thymine). Các nucleotid này liên kết với nhau theo một trật tự xác định. Giải trình tự của một gen tức là phát hiện được thứ tự sắp xếp của 4 loại nucleotid này trên phân tử DNA¹⁰⁵.

Có nhiều phương pháp giải trình tự gen, bao gồm: giải trình tự gen bằng phương pháp hóa học, phương pháp enzym và bằng máy tự động. Phương pháp hóa học để xác định trình tự DNA được Maxam và Gilbert phát hiện năm 1977, nhưng trên thực tế phương pháp này không dễ để thực hiện, vì nó đòi hỏi phải xác định nhiều thông số tối ưu cho thí nghiệm. Chính vì sự phức tạp này nên hiện nay phương pháp hóa học ít được sử dụng, thay vào đó các nhà khoa học dùng phương pháp enzym (phương pháp Sanger) với nhiều ưu điểm vượt trội hơn. Phương pháp enzym được Sanger và các cộng sự phát minh vào năm 1977¹⁰⁵. Phương pháp này ngày càng được hoàn thiện và sử dụng dễ dàng tại các phòng thí nghiệm. Các phòng thí nghiệm hiện nay thường dùng phản ứng giải trình tự bằng phương pháp Sanger nhưng khi làm giải trình tự thì thường dùng máy tự động chứ không dùng kỹ thuật xạ kí tự ghi như trước đây. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự gen theo phương pháp Sanger, sử dụng máy giải trình tự tự động ABI PRISM®3500 Genetic Analyzers.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

- Khoa Khám Bệnh và Khoa Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch Mai.
- Phân tích gen được thực hiện tại Labo bộ môn Sinh lý học, Sinh lý bệnh, Đại học Y Hà Nội và Labo sinh học phân tử, Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Thời gian nghiên cứu:

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 05/2015 đến tháng 11/2018.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là phụ nữ sau mãn kinh từ 40 tuổi trở lên đến khám và kiểm tra sức khỏe tại Khoa Khám Bệnh và Khoa Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch Mai.

2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Lâm sàng: Phụ nữ từ 40 tuổi trở lên có tiền sử khỏe mạnh và mãn kinh tự nhiên. Mãn kinh tự nhiên được định nghĩa là mất kinh liên tục từ 12 tháng trở lên.
- Các đối tượng tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu sau khi được nghe giải thích rõ mục đích nghiên cứu.
- Trí tuệ minh mẫn có khả năng trả lời được các câu hỏi trong bộ câu hỏi phỏng vấn.
- Tất cả các đối tượng nghiên cứu được đo mật độ xương tại Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân – Bệnh viện Bạch Mai trên cùng một máy Explorer của hãng Hologic – Mỹ. Dựa vào trị số T-score đo được, chúng tôi

phân nhóm dựa theo tiêu chuẩn chẩn đoán loãng xương của Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng (ISCD) và Hội Loãng xương Hoa Kỳ (NOF)^{108,109}:

+ Nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương khi trị số T-score tại vị trí cổ xương đùi hoặc đầu trên xương đùi hoặc cột sống thắt lưng $\leq -2,5$.

+ Nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương khi trị số T-score ở cả 3 vị trí này (cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng) $> -2,5$

2.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ:

- Phụ nữ sau mãn kinh có tiền sử mắc các bệnh mạn tính như bệnh gan, thận mạn tính, ung thư, các bệnh nội tiết và các rối loạn liên quan chuyển hóa vitamin D, chuyển hóa xương như như đái tháo đường, béo phì, hội chứng kém hấp thu, bệnh cường giáp, suy giáp, hội chứng Cushing được phát hiện qua hỏi tiền sử bệnh, khám lâm sàng và xét nghiệm cận lâm sàng.

- Phụ nữ sau mãn kinh sử dụng các loại thuốc liên quan đến chuyển hóa canxi và vitamin D trong 6 tháng vừa qua, như: corticoid, hormon sinh dục thay thế, heparin, bisphosphonat.

- Phụ nữ sau mãn kinh bị cắt bỏ tử cung, buồng trứng.

- Phụ nữ sau mãn kinh không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.3.2. Cỡ mẫu

* Cỡ mẫu mục tiêu 1:

Sử dụng công thức ước lượng một tỷ lệ trong quần thể:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

n: cỡ mẫu nhỏ nhất đạt được.

Z: hệ số tin cậy, ở mức xác suất 95%, $Z = 1,96$.

p: tỉ lệ alen quan tâm (minor alen) ở quần thể.

d : sai số cho phép, $d = 0,05$.

Theo cơ sở dữ liệu dbSNP¹¹⁰, chúng tôi có tỷ lệ minor alen (p) của 3 đa hình gen trên người châu Á . Ứng với mỗi đa hình gen chúng tôi có 1 giá trị p và chúng tôi sẽ tính ra cỡ mẫu n đối với mỗi gen.

+ Tỷ lệ alen T của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 là $p_1 = 0,12$; $n_1 = 163$.

+ Tỷ lệ alen G của đa hình gen *LRP5* rs41494349 là $p_2 = 0,08$; $n_2 = 114$.

+ Tỷ lệ alen T của đa hình gen *FTO* rs1121980 là $p_3 = 0,16$; $n_3 = 207$.

Vậy chúng tôi chọn cỡ mẫu cho mục tiêu 1 là cỡ mẫu lớn nhất của 3 đa hình gen: $n = 207$.

* Cỡ mẫu cho mục tiêu 2

Mục tiêu 2 tìm hiểu mối liên quan của 3 đa hình gen với mật độ xương và một số yếu tố nguy cơ loãng xương nên cỡ mẫu tối thiểu của mục tiêu 2 sẽ là: $n \times 2,5 = 207 \times 2,5 = 517,5$.

Trên thực tế, chúng tôi chọn 566 phụ nữ sau mãn kinh để tiến hành nghiên cứu.

2.3.3. Phương pháp chọn mẫu

Chọn mẫu cho nghiên cứu mô tả cắt ngang

- Tất cả phụ nữ sau mãn kinh từ 40 tuổi trở lên đến khám và kiểm tra sức khỏe tại Khoa Khám Bệnh và Khoa Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch mai đều được phỏng vấn theo bộ câu hỏi sàng lọc và khám sàng lọc bởi các bác sỹ chuyên khoa cơ xương khớp để loại trừ những phụ nữ có bệnh mạn tính, phụ nữ bị cắt tử cung, buồng trứng hoặc phụ nữ dùng thuốc liên quan đến chuyển hóa của xương.

- Sau khi phỏng vấn và khám sàng lọc đạt yêu cầu các đối tượng sẽ được xét nghiệm tể máu ngoại vi, máu lắng, urê, creatinin, glucose, enzym gan, protein phản ứng C (CRP) để loại trừ những bệnh nhân đái tháo đường, thiếu máu, enzym gan tăng, suy thận, nghi ngờ bệnh lý viêm hoặc ác tính (CRP tăng, máu lắng tăng).

- Mục đích của phỏng vấn, khám sàng lọc và xét nghiệm máu cơ bản nhằm chọn được phụ nữ sau mãn kinh tự nhiên có tiền sử khỏe mạnh, không mắc các bệnh lý và không dùng các thuốc ảnh hưởng đến mật độ xương.

- Những phụ nữ thỏa mãn tất cả tiêu chuẩn nghiên cứu sẽ được phỏng vấn theo bộ câu hỏi nghiên cứu, được thăm khám lâm sàng theo mẫu bệnh án nghiên cứu, được đo mật độ xương, được lấy máu để làm phân tích gen.

2.3.4. Quy trình phỏng vấn và khám lâm sàng

- Tuổi: là tuổi thực tế tính theo năm dương lịch.
- Tuổi có kinh: là tuổi bắt đầu có kỳ kinh nguyệt đầu tiên.
- Tuổi mãn kinh: Thời gian tính từ lúc bắt đầu tắt kinh.
- Thời gian mãn kinh: tuổi hiện tại trừ đi tuổi mãn kinh.
- Số con.
- Số lần mang thai.
- Khu vực sống: nông thôn hay thành thị
- Tiền sử gãy xương: không tính gãy xương do tai nạn giao thông hay ngã từ vị trí cao trên chiều cao cơ thể.
- Chiều cao: chiều cao được đo bằng thước gỗ đo chiều cao (độ chính xác 0,1cm). Thước được đặt theo chiều thẳng đứng, vuông góc với mặt đất nằm ngang. Đối tượng được đo chiều cao khi bỏ giày dép, đứng dựa lưng vào thước đo, mắt nhìn thẳng, hai tay buông thõng sao cho gót chân, bắp chân, hông, vai, cằm (9 điểm chạm) theo một đường thẳng và áp sát vào thước đo

đứng. Dùng thước vuông hoặc mảnh gỗ áp sát đỉnh đầu thẳng góc với thước đo và đọc kết quả.

- Cân nặng: cân nặng được đo bằng cân điện tử Tanita với độ chính xác 0,1 kg, kết quả tính bằng kg và ghi với 1 số lẻ. Cân đặt ở vị trí ổn định và bằng phẳng, chỉnh thẳng bằng về 0. Trước khi cân cần kiểm tra cân với một vật chuẩn để kiểm soát độ chính xác và độ nhạy của cân. Đối tượng bỏ giày dép, mặc quần áo gọn nhất, đứng giữa bàn cân, không cử động, mắt nhìn thẳng, trọng lượng phân bố đều trên 2 bàn chân.

- BMI: Được tính theo công thức:

$$\text{BMI} = \frac{m}{h^2}$$

Trong đó: m: cân nặng (kg)

h: chiều cao (m)

Phân loại BMI: Sử dụng phân loại BMI theo tiêu chuẩn năm 2000 của WHO dành cho các nước Châu Á Thái Bình Dương¹¹¹.

+ Gầy: BMI < 18,5

+ Bình thường: $18,5 \leq \text{BMI} \leq 22,9$

+ Thừa cân: $23 \leq \text{BMI} \leq 24,9$

+ Béo phì: BMI ≥ 25

- Hoạt động thể lực:

+ Bảng câu hỏi đánh giá hoạt động thể lực được dựa trên Bảng câu hỏi hoạt động thể lực Active-Q¹¹².(Phụ lục 1)

+ Các nội dung hoạt động thể lực bao gồm các câu hỏi trong bốn lĩnh vực: hoạt động thể lực trong thời gian làm việc, hoạt động thể lực khi di

chuyển tới nơi làm việc, hoạt động thể lực trong thời gian giải trí, hoạt động thể lực khi chơi thể thao.

Hỏi và đánh giá hoạt động thể lực: trong 1 tuần điển hình

Đơn vị: MET là đơn vị quy đổi được sử dụng trong đánh giá hoạt động thể lực. 1MET là chi phí năng lượng ngồi lặng lẽ, và tương đương với lượng calo tiêu thụ 1 kcal / kg / giờ.

Thời gian cho mỗi hoạt động trong tuần đều được quy đổi ra phút

Hoạt động thể lực nhẹ :từ 1 đến 3 MET

Hoạt động thể lực vừa phải: từ 3 đến 6 MET

Hoạt động thể lực mạnh mẽ: lớn hơn 6 MET

Tổng hoạt động thể lực trong tuần = \sum hoạt động thể lực (thời gian làm việc + thời gian di chuyển đến nơi làm việc + thời gian giải trí + thời gian chơi thể thao).

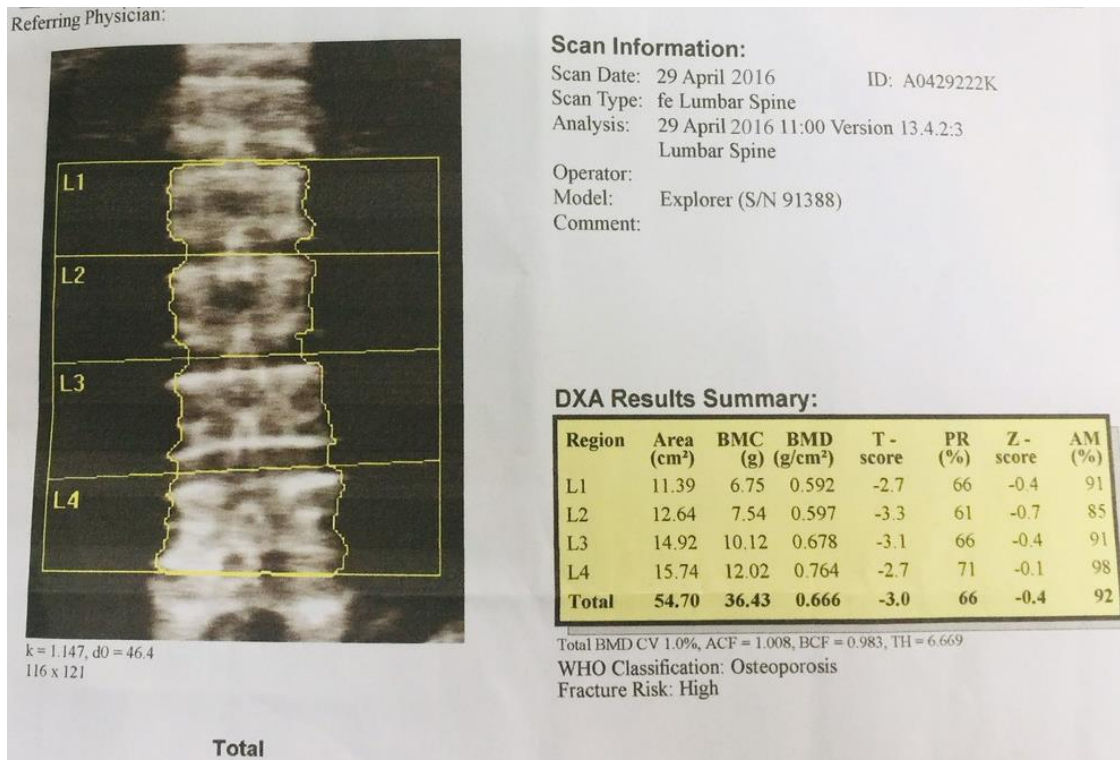
Theo khuyến nghị của Tổ chức Y tế thế giới, mức hoạt động thể lực cần đạt được đối với một người trưởng thành bình thường là từ 600 MET-phút/tuần trở lên. Hoạt động thể lực chưa đạt khi tổng hoạt động thể lực dưới 600 MET-phút/tuần^{112,115}.

2.3.5. Đo BMD theo phương pháp hấp thụ tia X năng lượng kép (DXA-Dual Energy X-ray Absorptiometry)

- Thiết bị sử dụng: Máy Explorer của hãng Hologic – Mỹ, tại Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân – Bệnh viện Bạch Mai, là máy đo hấp thụ tia X năng lượng kép thể hệ 3 chùm tia hình dẹt quạt góc rộng, có hệ thống tự động định kích cỡ. Mức sai số 1%. Khoảng cách các vùng quét: 1mm. Thời gian quét: 5-7 phút. Liều tia thấp 2-4mrem. Nguồn điện sử dụng: 110VAC-5A-60H. Bảo quản máy ở nhiệt độ: 18-27⁰C

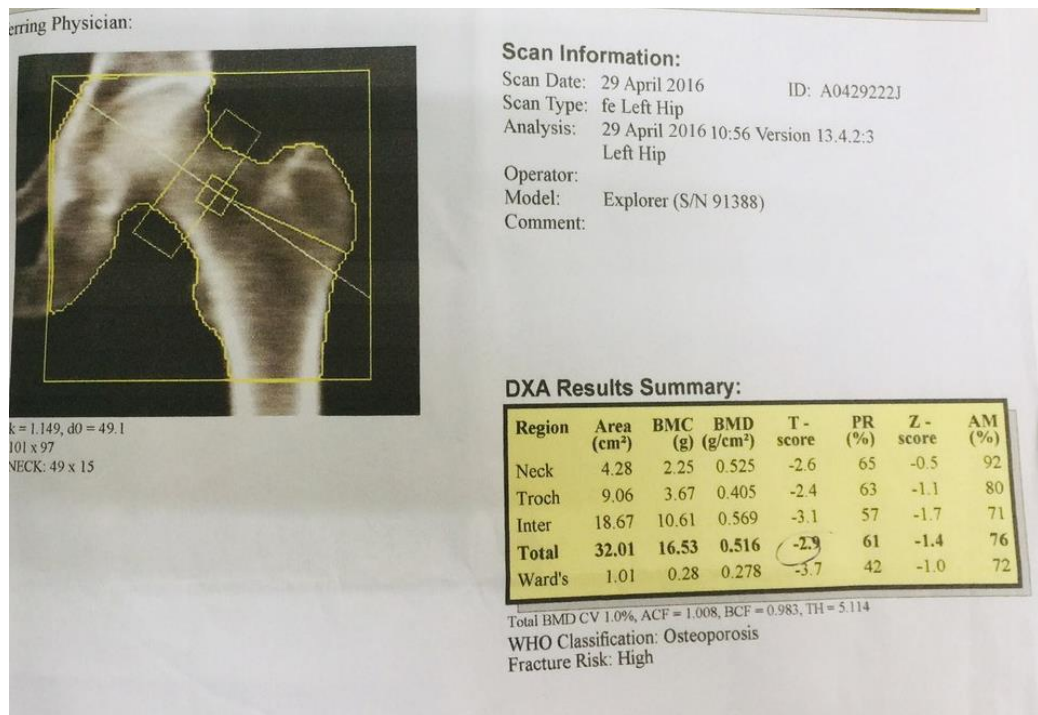
- Vị trí đo và phân tích kết quả: tại CSTL và CXĐ

+ *Tại CSTL*: đo ở 4 vị trí từ L1 đến L4. Khối lượng xương được đo ở mặt cắt theo chiều trước sau ở từng vùng tương ứng với vùng đo BMD. Kết quả cuối cùng được tính bằng trung bình cộng của các chỉ số vùng đo. BMD hiển thị bằng chỉ số T do máy tự động tính theo công thức của WHO.



Hình 2.1: Kết quả đo mật độ xương tại cột sống thắt lưng

+ *Tại CXĐ*: đo tại 4 vị trí là CXĐ, tam giác Ward, máu chuyên lớn, liên máu chuyên. Khối lượng xương được đo ở mặt cắt theo chiều trước sau ở từng vùng tương ứng với vùng đo BMD. Kết quả cuối cùng được tính bằng trung bình cộng của các chỉ số vùng đo. BMD hiển thị bằng chỉ số T do máy tự động tính theo công thức của WHO.



Hình 2.2: Kết quả đo mật độ xương tại cổ xương đùi

- Cách tính chỉ số T cho nghiên cứu của chúng tôi: khi có kết quả *iBMD* chúng tôi tiến hành tính lại chỉ số T với *pBMD* và *SD* được sử dụng theo giá trị tham chiếu của người Việt Nam. Từ đó tính được chỉ số T mới phù hợp cho người Việt Nam theo công thức sau:

$$T_{\text{score}} = \frac{iBMD - pBMD}{SD}$$

Trong đó: *iBMD* là mật độ xương của đối tượng *i*.

pBMD là mật độ xương trung bình của quần thể trong độ tuổi từ 20-40.

SD là độ lệch chuẩn của mật độ xương trung bình của quần thể trong độ tuổi 20-40.

Bảng 2.1. Mật độ xương đỉnh trung bình (g/cm²) trong quần thể của phụ nữ Việt Nam đo bằng máy Hologic⁴

Vị trí xương	Mật độ xương đỉnh pBMD(SD)	Tuổi BMD đạt đỉnh
CXĐ (Neck)	0,80(0.10)	25
ĐTXĐ (Total hip)	0,86(0.10)	32
CSTL (Total lumbar spine)	0,98(0.11)	30

+ Đánh giá mật độ xương tại mỗi vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL theo tiêu chuẩn của WHO:

Bình thường: $T_{score} \geq -1$

Giảm mật độ xương: $-2,5 < T_{score} < -1$

Loãng xương: $T_{score} \leq -2,5$

+ Đánh giá phụ nữ sau mãn kinh loãng xương hay không loãng xương theo tiêu chuẩn của Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng và Hội Loãng xương Hoa Kỳ:

Phụ nữ sau mãn kinh loãng xương khi có $T_{score} \leq -2,5$ ở ít nhất một trong ba vị trí (CXĐ, ĐTXĐ, CSTL)

Phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương khi có $T_{score} > 2,5$ ở cả ba vị trí (CXĐ, ĐTXĐ, CSTL)

2.3.6. Quy trình lấy máu phân tích gen và bảo quản

- Bệnh nhân được lấy máu tĩnh mạch ngoại vi 2 ml máu vào buổi sáng lúc đói vào ống chống đông EDTA.

- Máu được vận chuyển về phòng thí nghiệm bằng hộp xốp có đá.

- Máu được tách huyết tương huyết thanh lưu riêng trong tủ lạnh tại nhiệt độ -80°C .

- DNA được lưu giữ và bảo quản trong tủ lạnh tại nhiệt độ -20°C .

2.3.7. Các bước tiến hành phân tích gen

2.3.7.1. Dụng cụ và máy móc

- Máy ly tâm Kubola 3300
- Máy minispin
- Máy lắc vortex
- Máy đo mật độ quang NanoDrop 2000
- Máy ủ nhiệt Thermomixer comfort
- Máy PCR mastercycle epgradient
- Máy Genalyzer 3500 – ABI Mỹ.
- Máy điện di Mulpid Exu
- Máy chụp Geldoc
- Tủ an toàn sinh học
- Tủ lạnh bảo quản ở -4°C , -20°C , -80°C
- Ống PCR 0,2ml, ống eppendorf 1,5ml được khử trùng
- Bộ pipet
- Dầu côn các loại khử trùng và không có DNAase
- Giá để ống, phiên lạnh để mẫu
- Găng tay, áo choàng, giấy thấm
- Bút dạ, đồng hồ bấm giờ, thùng đựng rác

2.3.7.2. Hóa chất và sinh phẩm

* Hóa chất và sinh phẩm tách DNA.

- Lysis-bufer A -1lit:
- + 8,3 g NH_4Cl
- + 1,0 g KHCO_3
- + 2,0 ml 0,5 M EDTA
- TKM 1 –1 lit:

- + 10 ml 1M TRIS
- + 10 ml 1M KCl
- + 5ml 2M MgCl₂
- + 4 ml 0,5M EDTA
- NP – 40 (nonidet) 25%-100 ml:
 - + 25 g NP-40
 - + Nước cất hai lần vừa đủ 100 ml
- TKM 2 – 200 ml:
 - + 25 ml 5M NaCl
 - + 175 ml TKM1
- 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- 5M NaCl
- TE buffer:
 - + Tris HCl 10mM
 - + EDTA 1mM
- + Nước tinh sạch GIBCO UltraPure Distilled Water
- * Hóa chất và sinh phẩm để ủ PCR, điện di
 - 10X FastDigest Green Buffer
 - PCR Mastes mix 2x
 - Thang DNA chuẩn
 - Dung dịch EDTA
 - Đệm điện di Ultrapure TMTBE buffer 0,5X
 - Redsafe™
 - Thạch Agarose
 - Nước tinh sạch GIBCO UltraPure Distilled Water
 - Mẫu bệnh phẩm DNA đã được tách chiết

2.3.7.3. Kỹ thuật phân tích.

* Tách DNA, kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang bằng máy NanoDrop 2000

Máu tĩnh mạch của đối tượng nghiên cứu được chống đông bằng EDTA.

DNA tổng số được tách từ tế bào bạch cầu theo quy trình của Estonia.

Các bước tiến hành như sau:

+ Ngày thứ nhất:

- Lấy 2,5ml máu toàn phần vào ống 25 ml, cho dung dịch Lysis-bufer A vào đến 8,75 ml dung dịch (6,25 ml dung dịch Lysis-bufer A) lắc để tủ lạnh 30 phút.

- Ly tâm 2000 vòng trong 10 phút (ở 4°C)

- Bỏ dung dịch nổi cẩn thận, cho tiếp 7,5 ml dung dịch Lysis-bufer A vào ống rồi ly tâm 2000 vòng trong 10 phút.

- Bỏ dung dịch nổi cẩn thận, cho 1,6 ml dung dịch TKM 1 vào, lắc 1 lần cho tiếp 100 µl dung dịch 25% NP-40 vào ống lắc đều để được dung dịch đồng nhất.

- Để ống ở tủ -20°C

+ Ngày thứ 2:

- Làm tan chậm, ly tâm 2000 vòng 10 phút.

- Bỏ dung dịch nổi cẩn thận, cho 0,8ml dung dịch TKM2 vào, trộn chậm bằng pipet đến khi tan tủa. Cho tiếp 30 µl dung dịch SDS 10%, 800 µl TKM2, trộn bằng pipet đến khi tan tủa.

- Để lưu ống ở tủ ủ 56°C trong 20 phút.

- Cho nhanh 0,8 ml dung dịch 5M NaCl vào trộn bằng pipet đến khi tan tủa.

- Ly tâm 2000 vòng trong 10 phút.

- Đổ dịch nổi vào ống 25 ml chứa 5,25 ml cồn Ethanol 96% để lạnh ở -20°C. Trộn đều ống đến khi nhìn thấy DNA dùng pipet lấy tua DNA cho vào ống 0,375 ml cồn Ethanol 70% lạnh để rửa.

- Sau rửa để khô cồn bằng cách dựng ngược pipet.

- Cho DNA vào ống 1,5 ml chứa 0,25 ml dung dịch TE buffer rồi lắc đều cho đến khi DNA tan hết.

- Lưu tủ 4°C

Sau đó lấy 2 µl sản phẩm DNA tách chiết để kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang bằng máy NanoDrop 2000. Quy trình tiến hành theo hướng dẫn của máy

2.3.7.4. Xác định kiểu gen *FTO rs1121980*, *LRP5 rs41494349* bằng phương pháp *RFLP-PCR*

Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của các enzym cắt giới hạn đối với vị trí nhận biết của chúng trên DNA bộ gen. Khi ủ với enzym giới hạn ở dung dịch đệm, pH, nhiệt độ và thời gian thích hợp, đoạn DNA sẽ bị enzym giới hạn cắt ở vị trí đặc hiệu để tạo ra những phân đoạn DNA với kích thước khác nhau. Dựa vào kích thước các đoạn sau khi cắt để xác định alen và kiểu gen.

2.3.7.4.1 Xác định kiểu gen *FTO rs1121980* bằng phương pháp *RFLP-PCR*

Bước 1. Cặp môi sử dụng:

Cặp môi được nhóm nghiên cứu tự thiết kế dựa trên công cụ hỗ trợ thiết kế môi của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

FTO_rs1121980F: 5'-TCTATCCTGCATGTAATGAG-3'

FTO_rs1121980R: 5'-GTCACGTGTCTTGGTACCAT-3'

Bước 2. Thực hiện nhân đoạn gen bằng phản ứng PCR

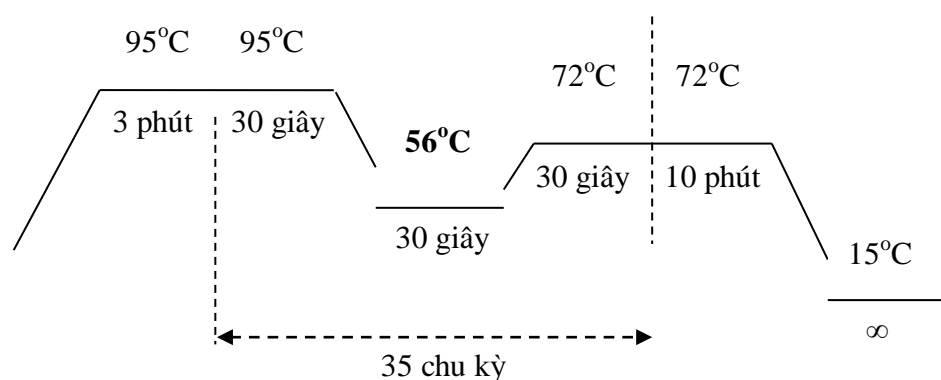
- Pha Master mix

Số phản ứng cần chạy sẽ được tính bằng tổng số mẫu cần phân tích cộng thêm một mẫu chứng âm và một mẫu chứng dương.

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Lượng cần/ phản ứng	Số phản ứng	Tổng lượng
Nuclease-free water	4 μ l		μ l
PCR Master mix 2X	10 μ l		μ l
FTO_rs1121980F (10 μ M)	2 μ l		μ l
FTO_rs1121980R (10 μ M)	2 μ l		μ l
DNA	2 μ l		-
Tổng lượng	20 μ l		-

- Chu trình nhiệt chạy PCR



Bước 3. Điện di kiểm tra 5 μ l sản phẩm PCR (280 bp) trên gel agarose 2,5%, 135V trong 30 phút, đệm TBE 0,5X, nhuộm Redsafe, DNA ladder 100bp

Bước 4. Ủ với enzyme cắt giới hạn FastDigest *NdeI* ở 37°C trong 60 phút
Số phản ứng cần ủ sẽ tương đương với số phản ứng đã chạy PCR

Thành phần	Lượng cần/phản ứng	Số phản ứng	Tổng lượng
Nuclease-free water	8,3 µl		µl
FastDigest Green buffer 10X	1,4 µl		µl
FastDigest <i>NdeI</i>	0,3 µl		µl
Sản phẩm PCR	10 µl		-
Tổng lượng	20 µl		-

Bước 5. Điện di kiểm tra 20 µl sản phẩm sau ủ trên gel agarose 2,5%, 135V trong 40 phút, đệm TBE 0,5X, nhuộm Redsafe, DNA ladder 100bp

Bước 6. Nhận định kết quả

- Kiểu gen CC: băng 280 bp
- Kiểu gen CT: băng 280 bp + 259 bp + 21 bp
- Kiểu gen TT: băng 259 bp + 21 bp

2.4.5.4.2. Xác định kiểu gen *LRP5 rs41494349* bằng phương pháp RFLP-PCR

Bước 1. Cặp môi sử dụng

Cặp môi được nhóm nghiên cứu tự thiết kế dựa trên công cụ hỗ trợ thiết kế môi của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

LRP5_F (4µM): 5'-CTCTGGGCATAGTGCTCCATC-3'

LRP5_R (4µM): 5'-CCGGAGATGACCACGTTCTG-3'

Bước 2. Thực hiện nhân đoạn gen bằng phản ứng PCR

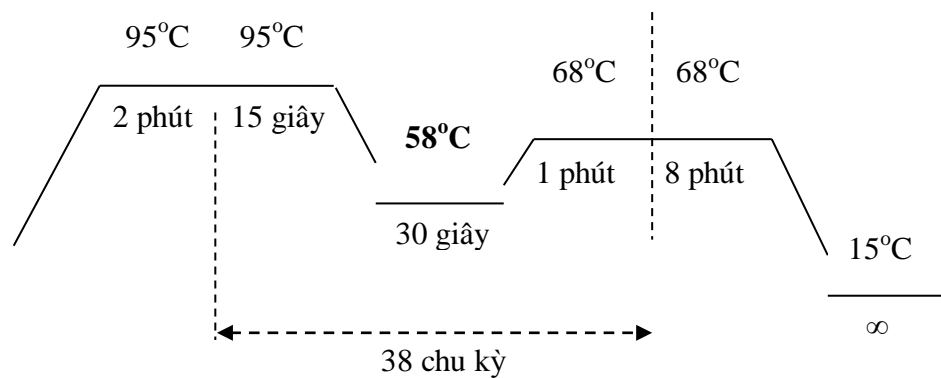
- Pha Master mix

Số phản ứng cần chạy sẽ được tính bằng tổng số mẫu cần phân tích cộng thêm một mẫu chứng âm và một mẫu chứng dương.

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Lượng cần/phản ứng	Số phản ứng	Tổng lượng
Nuclease-free water	4 μ l		μ l
PCR Master mix 2X	10 μ l		μ l
LRP5_F (4 μ M)	2 μ l		μ l
LRP5_R (4 μ M)	2 μ l		μ l
DNA	2 μ l		-
Tổng lượng	20 μ l		-

- Chu trình nhiệt chạy PCR



Bước 3. Điện di kiểm tra 5 μ l sản phẩm PCR (308 bp) trên gel agarose 2,5%, 135V trong 30 phút, đệm TBE 0.5X, nhuộm Redsafe, DNA ladder 100bp

Bước 4. Ủ với enzyme cắt giới hạn Eco47I (AvaII) ở 37°C trong 60 phút

Số phản ứng cần ủ sẽ tương đương với số phản ứng đã chạy PCR

Thành phần	Lượng cần/phản ứng	Số phản ứng	Tổng lượng
Nuclease-free water	7 μ l		μ l
10X buffer R	2 μ l		μ l
Eco47I	1 μ l		μ l
Sản phẩm PCR	10 μ l		-
Tổng lượng	20 μ l		-

Bước 5. Điện di kiểm tra 20 µl sản phẩm sau ủ trên gel agarose 2,5%, 135V trong 40 phút, đệm TBE 0,5X, nhuộm Redsafe, DNA ladder 100bp

Bước 6. Nhận định kết quả

- Kiểu gen AA: băng 308 bp
- Kiểu gen AG: băng 308 bp + 257 bp + 51 bp
- Kiểu gen GG: băng 257 bp + 21 bp

2.3.7.5. Quy trình xác định kiểu gen MTHFR rs1801133 bằng ARMS-PCR

Bước 1. Cặp mồi sử dụng

Cặp mồi được nhóm nghiên cứu tự thiết kế dựa trên công cụ hỗ trợ thiết kế mồi của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

MTHFR C677T F: 5-TGC TGT TGG AAG GTG CAA GAT-3

MTHFR C677T Rwt: 5-GCG TGA TGA TGA AAT CGG-3

MTHFR C677T Rm: 5-GCG TGA TGA TGA AAT CGA-3

Bước 2. Thực hiện nhân đoạn gen bằng phản ứng PCR

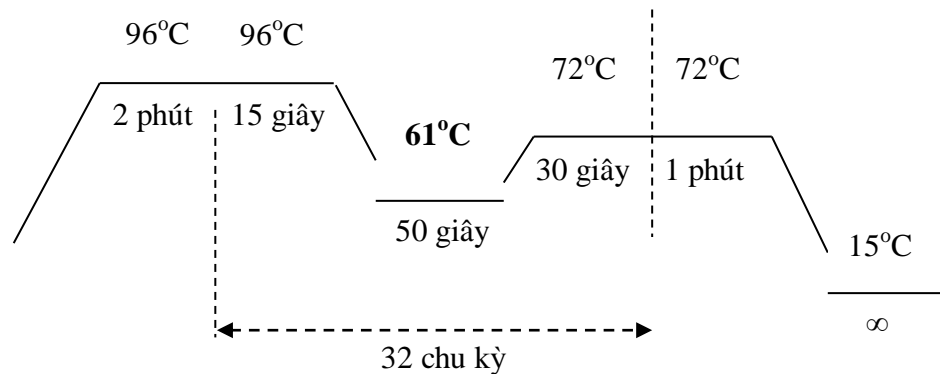
- Pha Master mix

Số phản ứng cần chạy sẽ được tính bằng tổng số mẫu cần phân tích cộng thêm một mẫu chứng âm và một mẫu chứng dương.

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Lượng cần/phản ứng	Số phản ứng	Tổng lượng
Nuclease-free water	4.5 µl		µl
PCR Master mix 2X	7.5 µl		µl
MTHFR C677T F (10µM)	0.5 µl		µl
MTHFR C677T Rwt/ Rm (10µM)	0.5 µl		µl
DNA	2 µl		-
Tổng lượng	15 µl		-

- Chu trình nhiệt chạy PCR



Bước 3. Điện di kiểm tra 15 μ l sản phẩm PCR trên gel agarose 2,5%, 135V trong 20 phút, đệm TBE 0,5X, nhuộm Redsafe, DNA ladder 100bp

Bước 4. Nhận định kết quả: Sản phẩm ở vị trí 226bp

- Kiểu gen CC: 1 băng ở giếng Rwt
- Kiểu gen CT: 2 băng ở 2 giếng Rwt và Rm
- Kiểu gen TT: 1 băng ở giếng Rm

2.3.7.6. Phương pháp giải trình tự gen

- Với đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có 3 kiểu gen (CC, CT, TT), với đa hình gen *LRP5* rs41494349 có 3 kiểu gen (AA, AG, GG), với đa hình gen *FTO* rs1801122 có 2 kiểu gen (CC và CT). Ứng với mỗi kiểu gen chúng tôi sẽ lấy 3 mẫu ngẫu nhiên, tổng cộng có 24 mẫu được tiến hành giải trình tự gen trực tiếp theo phương pháp Sanger.

- PCR cho giải trình tự: sản phẩm PCR tinh sạch sẽ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR sử dụng bộ kit BigDye Terminator V3.1 theo hai chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Mỗi phản ứng PCR cho giải trình tự gen bao gồm: 1 μ l BigDye sequencing Buffer 5X, 1 μ l mỗi xuôi hoặc mỗi ngược 1,6 pmol/ μ l, 1 μ l Big Dye, 2-4 μ l DNA đã được tinh sạch và nước cho tổng thể tích là 10 μ l. Kỹ thuật PCR cho giải trình tự gen được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu ở 96°C trong

vòng 1 phút, tiếp theo là 25 chu kỳ của sự biến tính ở 96°C trong 10 giây; 50°C trong 5 giây; 60°C trong 4 phút. Giảm nhiệt nhanh đến 4°C và giữ cho đến khi sử dụng.

- Tinh sạch sản phẩm PCR cho sequencing: sau khi PCR cho giải trình tự, 3µl EDTA và 60µl ethanol 100% được bổ sung vào sản phẩm PCR, tiếp theo tiến hành ly tâm 4000rpm trong 30 phút ở 4°C. Sau đó DNA kết tủa được sấy khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

- Biến tính mẫu: bổ sung 10µl Hi-Di vào từng mẫu. Sau đó trộn đều mẫu. Mẫu được biến tính ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh nhanh bằng đá.

- Mẫu đã sẵn sàng cho giải trình tự: trình tự của các đoạn DNA được xác định trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM®3500 Genetic Analyzers. Các nucleotid trên đoạn gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A, T, G, C.

So sánh kết quả xác định các kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự gen ở mẫu ngẫu nhiên với kết quả xác định kiểu gen bằng phương pháp RFLP -PCR và ARMS –PCR. Kết quả tương đồng 24/24. Từ đó, chúng tôi thấy phương pháp RFLP -PCR và ARMS – PCR là kỹ thuật đáng tin cậy và có thể sử dụng phân tích kiểu gen *FTO* rs1121980, *LRP5* rs41494349, *MTHFR* rs1801133.

2.3.7.7. Phân tích kết quả xác định kiểu gen và alen

- Sự tồn tại của các alen đột biến hoặc bình thường được khẳng định bằng sự xuất hiện của sản phẩm DNA tương ứng độ dài đã biết trước. Đối chứng kết quả điện di với thang chuẩn DNA để biết kích thước của các sản phẩm PCR.

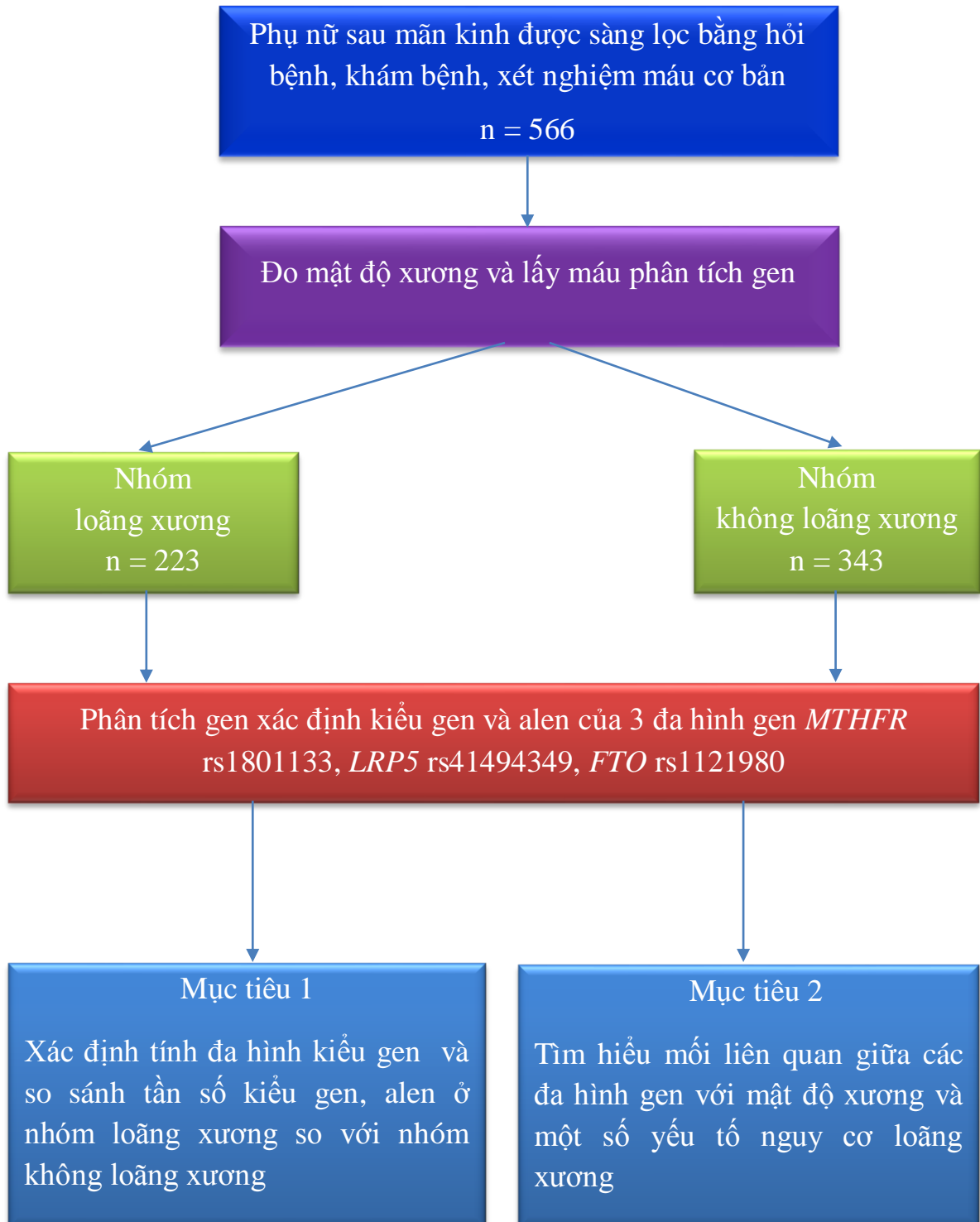
- Kết quả được kiểm tra lại bằng giải trình tự gen
- Phân loại các mẫu kết quả kiểu gen theo nhóm
- Kết quả được trình bày dạng tỷ lệ phần trăm

2.4. Các biến số nghiên cứu

Bảng 2.2. Các biến số nghiên cứu

Tên biến số	Loại biến	Đơn vị	Phương pháp thu thập	Công cụ thu thập	Tiêu chuẩn đánh giá
Tuổi	Liên tục	Năm	Phỏng vấn	Bệnh án	
Tuổi có kinh	Liên tục	Năm	Phỏng vấn	Bệnh án	
Tuổi mãn kinh	Liên tục	Năm	Phỏng vấn	Bệnh án	
Số năm mãn kinh	Liên tục	Năm	Phỏng vấn	Bệnh án	
Số con	Liên tục	con	Phỏng vấn	Bệnh án	
Khu vực sống	Phân loại	Nôngthôn/ Thành thị	Phỏng vấn	Bệnh án	
Chiều cao	Liên tục	Cm	Khám	Thước	
Cân nặng	Liên tục	Kg	Khám	Cân điện tử	
BMI	Liên tục	Kg/m ²	Khám	Cân nặng/ Chiều cao ²	WHO
Hoạt động thể lực	Liên tục	MET- phút/ tuần	Hỏi, tính, quy đổi	Bộ câu hỏi Active - Q	
Tiền sử gãy xương	Phân loại	Có/ Không	Phỏng vấn	Bệnh án	
BMD CXĐ	Liên tục	g/cm ²	Khám	Máy đo mật độ xương Hologic	WHO
BMD ĐTXĐ	Liên tục	g/cm ²	Khám	Máy đo mật độ xương Hologic	WHO
BMD CSTL	Liên tục	g/cm ²	Khám	Máy đo mật độ xương Hologic	WHO
Kiểu gen <i>MTHFR</i> rs1801133	Phân loại	CC/CT/TT	Phân tích gen	ARMS- PCR	
Kiểu gen <i>LRP5</i> rs41494349	Phân loại	AA/AG/GG	Phân tích gen	RFLP-PCR	
Kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980	Phân loại	CC/CT/TT	Phân tích gen	RFLP-PCR	

2.5. Sơ đồ nghiên cứu



2.6. Sai số và không chế sai số.

* Sai số:

- Sai số nhớ lại: đối tượng trả lời không đúng hoặc không trả lời.
- Sai số hệ thống: sai số trong quá trình thu thập số liệu, đo lường, nhập liệu và phân tích số liệu.
- Sai số do dụng cụ đo lường, kỹ thuật đo lường, kỹ thuật đo mật độ xương và kỹ thuật tách chiết ADN, phân tích gen.

* Không chế sai số:

- Các đối tượng nghiên cứu được phỏng vấn, khám lâm sàng, đo chiều cao, cân nặng, kiểm tra kết quả xét nghiệm máu bởi bác sỹ chuyên khoa Cơ Xương Khớp đã được tập huấn.
- Các đối tượng nghiên cứu được đo mật độ xương trên cùng một máy Explorer của hãng Hologic – Mỹ đặt tại Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân – Bệnh viện Bạch Mai bởi kỹ thuật viên đã được tập huấn.
- Các phương pháp tách chiết ADN, phân tích các kiểu gen được thực hiện tại labo Bộ môn Sinh lý bệnh, Đại học Y Hà nội bởi Bác sỹ Sinh lý bệnh đã được đào tạo về phân tích gen. Kết quả này được kiểm tra lại tại labo Bộ môn Sinh lý học bởi Bác sỹ sinh lý học đã được đào tạo về phân tích gen.
- Làm sạch số liệu trước khi nhập vào máy tính, phát hiện thiếu số liệu và số liệu vô lý, mã hóa trước khi nhập.

2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập và kiểm tra bằng phần mềm REDCap. Các biến định lượng được trình bày dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn (SD) nếu phân bố chuẩn hoặc trung vị và khoảng tứ phân vị nếu không phân bố chuẩn. Các biến định tính được trình bày dưới dạng tần số và tỷ lệ phần trăm. Với biến liên tục, so sánh giữa các giá trị trung bình được thực hiện bằng kiểm định Independent samples T test hoặc phân tích phương sai một yếu tố hoặc Mann

Whitney-U test hoặc Kruskal-Wallis test. Với các biến phân loại, so sánh giữa các tỷ lệ được thực hiện bằng kiểm định Chisquare test hoặc Fisher Exact test. Phân tích mối liên quan của kiểu gen cùng các yếu tố khác (tuổi, cân nặng, chiều cao, BMI, khu vực và trình độ học vấn, tiền sử gãy xương) với mật độ xương tại 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL bằng phân tích hồi quy tuyến tính đơn biến và đa biến.

Với mỗi gen, các kiểu gen được mã hoá và đưa vào các mô hình giả định để phân tích: Mô hình trội, mô hình đồng trội, mô hình siêu trội, mô hình lặn và mô hình cộng hợp. Tần số alen, kiểu gen được trình bày theo tần số (%) và quy luật Hardy-Weinberg-Equilibrium về sự phân bố kiểu gen trong quần thể được kiểm định bằng Chisquare test hoặc Fisher exact test. Phân tích hồi quy tuyến tính đơn biến được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng đơn gen đối với mật độ xương ở 3 vị trí. Ảnh hưởng của các yếu tố di truyền được phân tích trong các mô hình hồi quy đa biến sau khi điều chỉnh theo các yếu tố nguy cơ khác. Nhóm đối tượng không có hoặc có một alen nguy cơ được sử dụng làm nhóm tham chiếu.

Hệ số hồi quy (coefficient) chưa hiệu chỉnh và sau khi hiệu chỉnh được tính toán với khoảng tin cậy 95%. Giá trị $p < 0,05$ theo 2 phía được coi là có ý nghĩa thống kê.

Phần mềm ngôn ngữ R phiên bản 3.6.3 được sử dụng để phân tích thống kê và vẽ biểu đồ.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu này sử dụng một phần số liệu trong đề tài “Xác định tính đa hình và sự nhạy cảm của các gen liên quan đến loãng xương và gãy xương trên người Việt Nam” do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) tài trợ đã được chứng nhận chấp thuận bởi hội đồng đạo đức

trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng số 01/HĐĐĐ-VNCYHĐTH ngày 27 tháng 01 năm 2016.

- Các đối tượng tham gia nghiên cứu được cung cấp đầy đủ thông tin về mục đích của nghiên cứu, quy trình tiến hành, ký phiếu chấp nhận đồng ý tham gia nghiên cứu, có quyền rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia.

- Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật.

- Các kỹ thuật thao tác trên bệnh nhân được đảm bảo đúng chuyên môn.

- Đề tài nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn vì mục đích khoa học chứ không vì mục đích nào khác.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 566 phụ nữ sau mãn kinh được khám sàng lọc tại Khoa Khám Bệnh và Khoa Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch Mai

Bảng 3.1: Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm nghiên cứu (n = 566)
^a Tuổi (năm)	59,6 ± 7,39
^a Chiều cao (cm)	152,0 ± 5,48
^a Cân nặng (kg)	51,29 ± 7,37
^a BMI (kg/m ²)	22,13 ± 2,70
^b Phân nhóm BMI	
Bình thường	327 (57,8)
Thiếu cân	40 (7,1)
Thừa cân và béo phì	199 (35,1)
^b Nơi sống	
Nông thôn	428 (75,6)
Thành thị	138 (24,4)
^b Hoạt động thể lực (MET-phút/tuần)	
Chưa đạt (<600)	242 (42,8)
Đạt (≥600)	324 (57,2)
^a Đặc điểm tiền sử sản khoa	
Số con	3,3 ± 1,5
Tuổi mãn kinh (năm)	48,9 ± 3,8
Số năm mãn kinh (năm)	10,6 ± 8,41
^b Đặc điểm tiền sử gãy xương, n (%)	
Không	505 (89,2)
Có	61 (10,8)

a: Các biến tuân theo quy luật phân phối chuẩn được biểu diễn bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

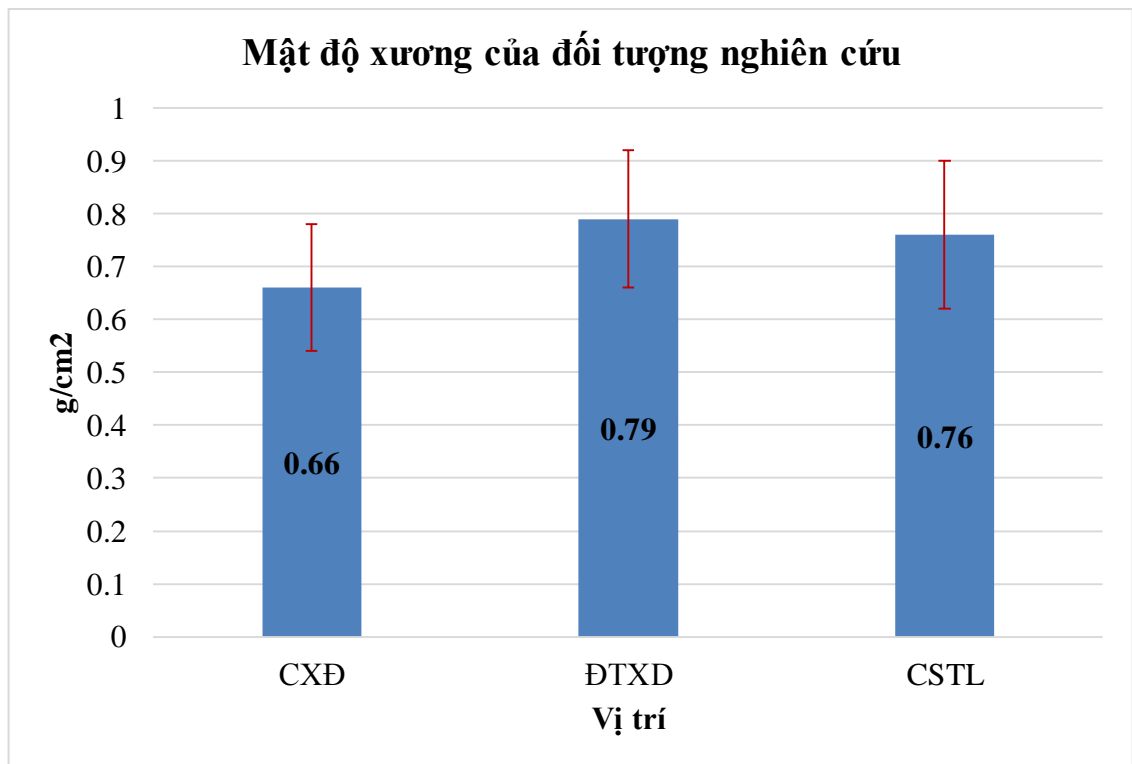
b: Biến phân loại được biểu diễn bằng phần trăm (số lượng).

Nhận xét:

- Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 59,6 tuổi, cân nặng trung bình 51,29 kg, chiều cao trung bình là 152 cm, BMI trung bình là 22,13 kg/m².

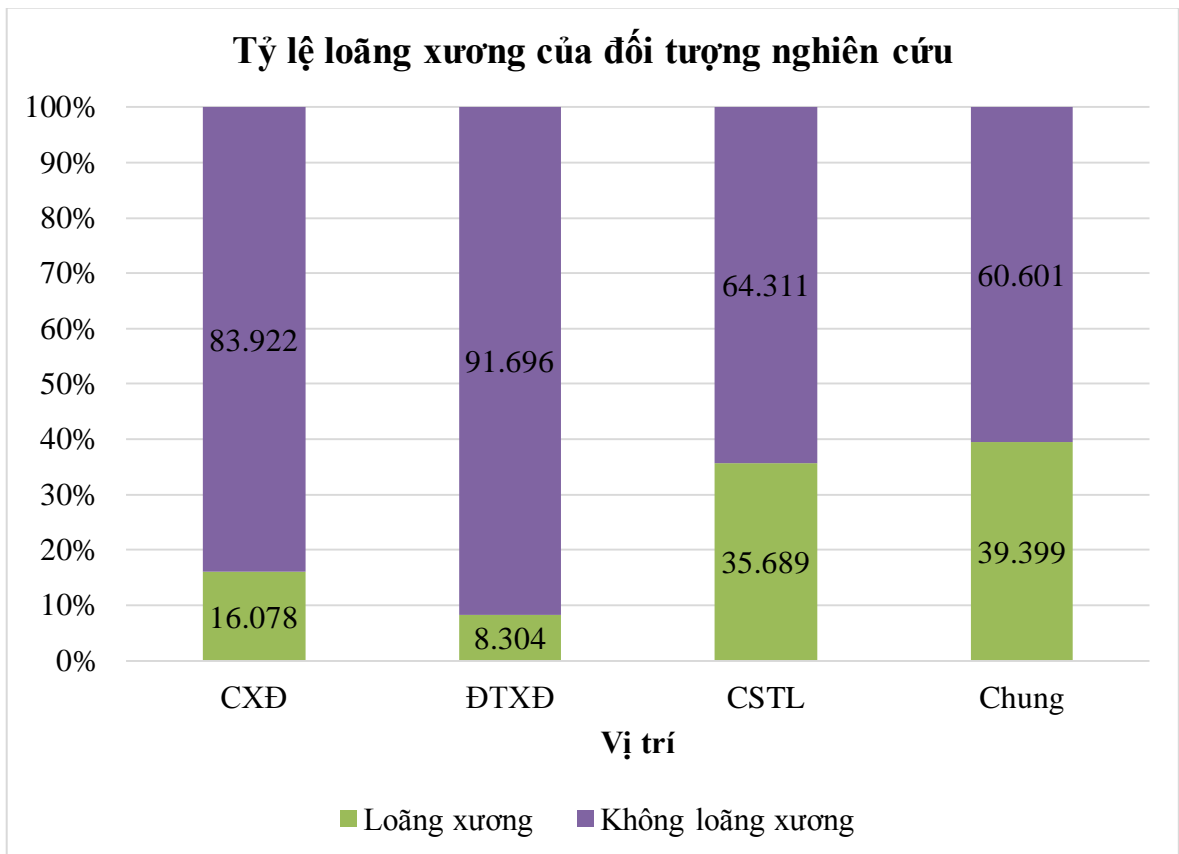
- Trong phân nhóm BMI, nhóm BMI bình thường chiếm tỷ lệ cao nhất 57,8%, nhóm thừa cân và béo phì chiếm tỷ lệ 35,2%, nhóm thiếu cân chiếm 7,1%

- Tỷ lệ hoạt động thể lực đạt chiếm 51,8%, tuổi mãn kinh trung bình là 48,9 tuổi, số năm sau mãn kinh trung bình là 10,6 năm, số con trung bình là 3,3 con, 10,8% phụ nữ sau mãn kinh có tiền sử gãy xương.



Biểu đồ 3.1: Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

Nhận xét: Mật độ xương tại đầu trên xương đùi là cao nhất, trong khi mật độ xương tại cổ xương đùi là thấp nhất.



Biểu đồ 3.2: Phân bố tỷ lệ loãng xương của đối tượng nghiên cứu

Nhận xét:

- Trong ba vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL thì tỷ lệ loãng xương tại CSTL là cao nhất, tỷ lệ loãng xương tại ĐTXĐ là thấp nhất.

- Tỷ lệ loãng xương chung (loãng xương ở bất cứ một trong ba vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL) là 39,4%.

Bảng 3.2: Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu theo phân nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương

Phân nhóm	Loãng xương n=223	Không loãng xương n=343	P
Đặc điểm			
^a Tuổi (năm)	63,88 (8,00)	56,75 (5,35)	<0,001
^a Chiều cao (cm)	150,38 (5,76)	153,21 (4,98)	<0,001
^a Cân nặng (kg)	47,68 (6,71)	53,63 (6,81)	<0,001
^a BMI (kg/m ²)	21,05 (2,48)	22,84 (2,61)	<0,001
^b Phân nhóm BMI			<0,001
Bình thường	147 (65,9%)	180 (52,5%)	
Thiếu cân	29 (13,0%)	11 (3,2%)	
Thừa cân và béo phì	47(21,1%)	152 (44,3)	
^b Nơi sống			0,304
Nông thôn	163 (73,2%)	265 (77,3%)	
Thành thị	60 (26,8%)	78 (22,7%)	
^b Hoạt động thể lực (MET- phút/tuần)			<0,001
Chưa đạt (<600)	121(54,3%)	124 (36,2%)	
Đạt (≥600)	102 (45,7%)	219 (63,8%)	
^a Đặc điểm tiền sử sản khoa			
Số con	3,69 (1,81)	3,01 (1,24)	<0,001
Tuổi mãn kinh (năm)	48,08 (4,21)	49,49 (3,41)	<0,001
Số năm mãn kinh (năm)	15,81 (9,08)	7,27 (5,88)	<0,001
^b Đặc điểm tiền sử gãy xương			0,019
Không	190 (85,2%)	315 (91,8%)	
Có	33 (14,8%)	28 (8,2%)	

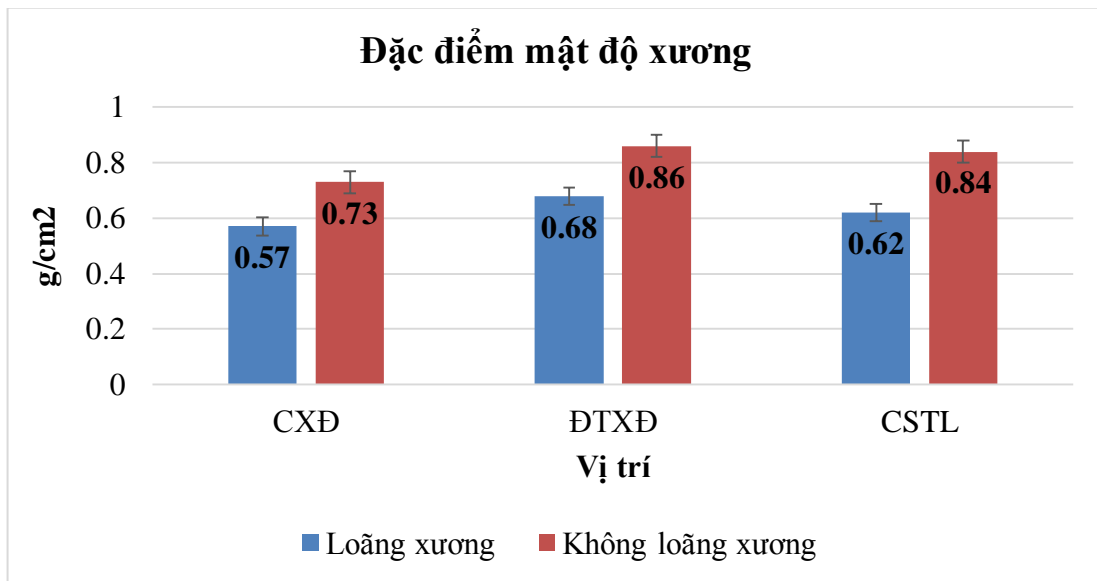
a: Các biến tuân theo quy luật phân phối chuẩn được biểu diễn bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, giá trị p nhận được từ kiểm định Independent samples T test.

b: Biến phân loại được biểu diễn bằng phần trăm (số lượng), giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test.

Nhận xét:

- Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tuổi, chiều cao, cân nặng, BMI, phân nhóm BMI, số con, tuổi mãn kinh, số năm mãn kinh, hoạt động thể lực và tiền sử gãy xương của nhóm loãng xương so với nhóm không loãng xương.

- Không có sự khác biệt về tỷ lệ phụ nữ sau mãn kinh sống ở thành thị và nông thôn của nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương.



Biểu đồ 3.3: Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu theo phân nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương

Nhận xét:

- Giá trị mật độ xương của nhóm không loãng xương thấp hơn nhóm loãng xương ở cả ba vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL ($p < 0,001$).

3.2. Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 của đối tượng nghiên cứu

3.2.1. Nồng độ DNA và độ tinh sạch trung bình

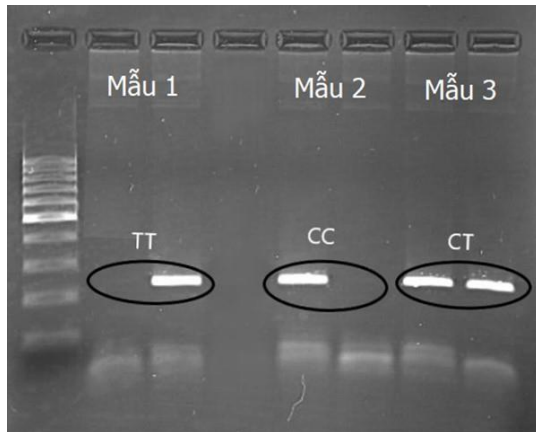
Bảng 3.3. Nồng độ DNA và độ tinh sạch trung bình

Thông số	Mẫu nghiên cứu (n=566)
Nồng độ DNA (ng/ul), median (min – max)	284,71 (36,5 – 1173,8)
Độ tinh sạch (A260/A280), median (min – max)	1,90 (1,52 – 2,09)

Nhận xét:

Nồng độ DNA và độ tinh sạch cho thấy các mẫu DNA của chúng tôi đủ tiêu chuẩn để thực hiện phân tích gen.

3.2.2. Kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR rs1801133*



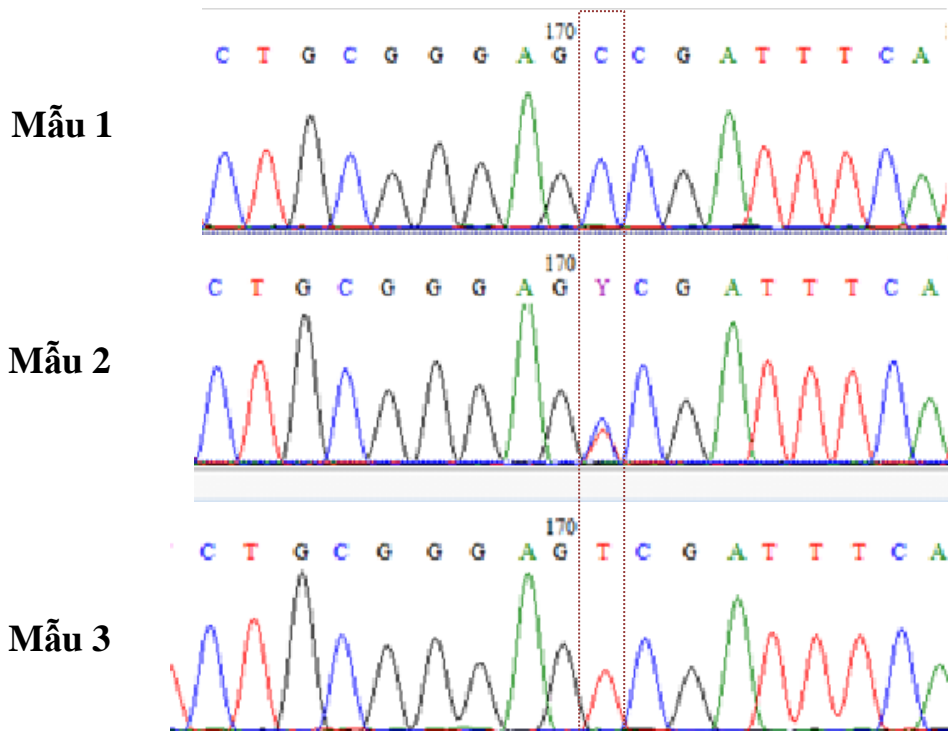
Kiểu gen được đọc ở 2 giếng:

- Chỉ lên band ở giếng đầu: kiểu gen CC (mẫu 2)
- Chỉ lên band ở giếng thứ 2: kiểu gen TT (mẫu 1)
- Lên band ở cả 2 giếng: kiểu gen CT (mẫu 3)

Alen T là alen hiếm

Band của alen C và T đều nằm ở 226bp.

Hình 3.1. Kết quả xác định kiểu gen *MTHFR rs1801133* bằng phương pháp ARMS-PCR



Hình 3.2. Kết quả xác định kiểu gen *MTHFR rs1801133* bằng phương pháp giải trình tự gen

Mẫu 1(ID:3389): Tại vị trí SNP xuất hiện một đỉnh chỉ thị loại nucleotide C, tương ứng kiểu gen CC

Mẫu 2(ID:3391): Tại vị trí SNP xuất hiện 2 đỉnh do một nửa alen mang nucleotid C, một nửa alen mang nucleotid T, tương ứng kiểu gen CT.

Mẫu 3(ID:3390): Tại vị trí SNP xuất hiện một đỉnh chỉ thị loại nucleotide T, tương ứng kiểu gen TT

Bảng 3.4. Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 của đối tượng nghiên cứu

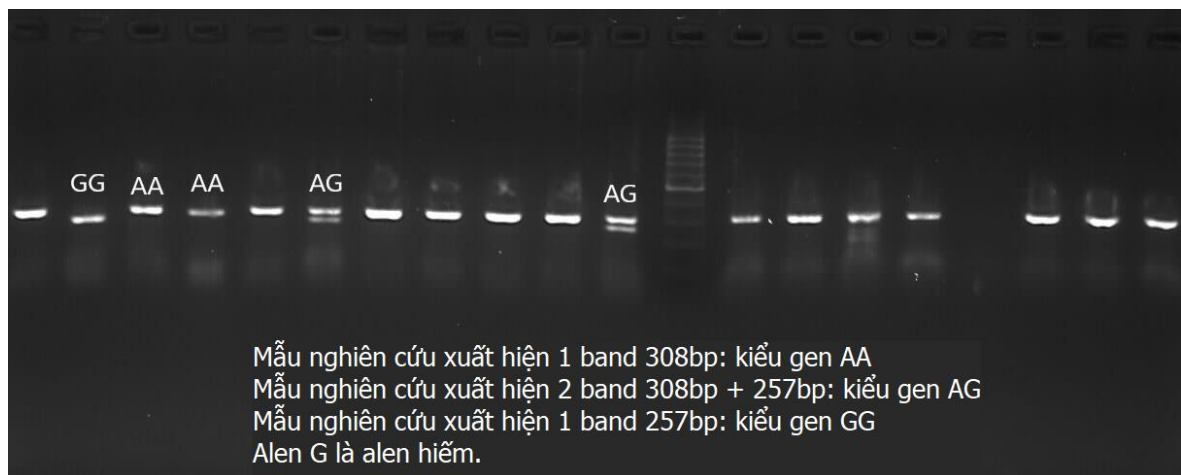
Alen và kiểu gen		<i>MTHFR</i> rs1801133	
		n = 566	Tỷ lệ (%)
Kiểu gen (n)	CC	404	71,4
	CT	152	26,8
	TT	10	1,8
Alen (2n)	C	960	84,8
	T	172	15,2
p theo HDW		p = 0,317	

Giá trị p theo HDW nhận được từ kiểm định Hardy Weinberg.

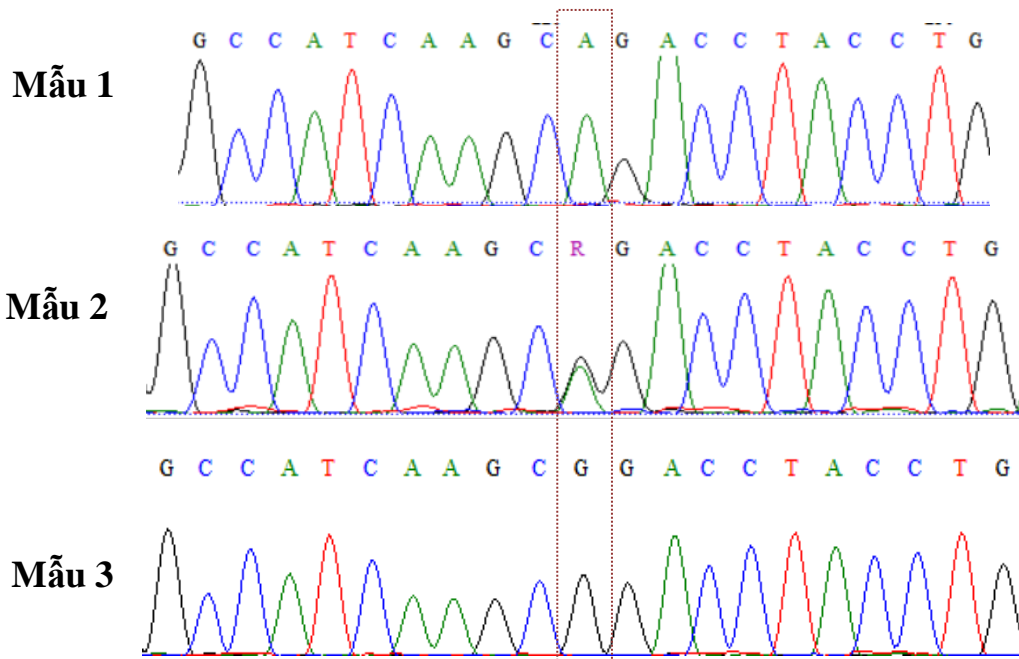
Nhận xét:

- Phân bố kiểu gen *MTHFR* rs1801133 trong nhóm nghiên cứu đạt cân bằng định luật Hardy Weinberg.
- Tỷ lệ alen T chiếm 15,2%. Có 10 bệnh nhân có kiểu gen TT chiếm 1,8%.

3.2.3. Kiểu gen và alen của đa hình gen *LRP5* rs41494349



Hình 3.3. Kết quả xác định kiểu gen *LRP5* rs41494349 bằng phương pháp RFLP-PCR



Hình 3.4. Xác định kiểu gen *LRP5* rs41494349 bằng phương pháp giải trình tự gen

Mẫu 1 (ID:3336): Tại vị trí SNP xuất hiện một đỉnh chỉ thị loại nucleotide A, tương ứng kiểu gen AA

Mẫu 2 (ID:3343): Tại vị trí SNP xuất hiện 2 đỉnh do một nửa alen mang nucleotid A, một nửa alen mang nucleotid G, tương ứng kiểu gen AG.

Mẫu 3 (ID:3140): Tại vị trí SNP xuất hiện một đỉnh chỉ thị loại nucleotide G, tương ứng kiểu gen GG

Bảng 3.5. Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *LRP5* rs41494349 của đối tượng nghiên cứu

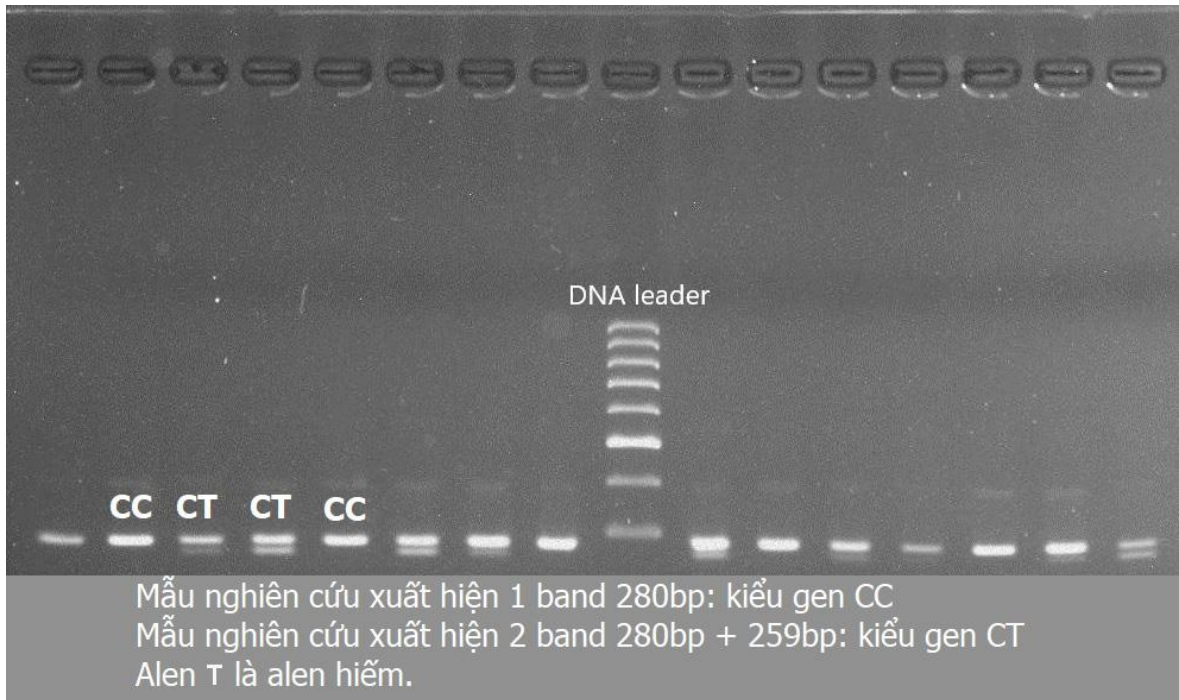
Alen và kiểu gen		<i>LRP5</i> rs41494349	
		n = 566	Tỷ lệ (%)
Kiểu gen (n)	AA	480	84,8
	AG	82	14,5
	GG	4	0,7
Alen (2n)	A	1042	92,0
	G	90	8,0
p theo HDW		p = 0,808	

Giá trị p theo HDW nhận được từ kiểm định Hardy Weinberg.

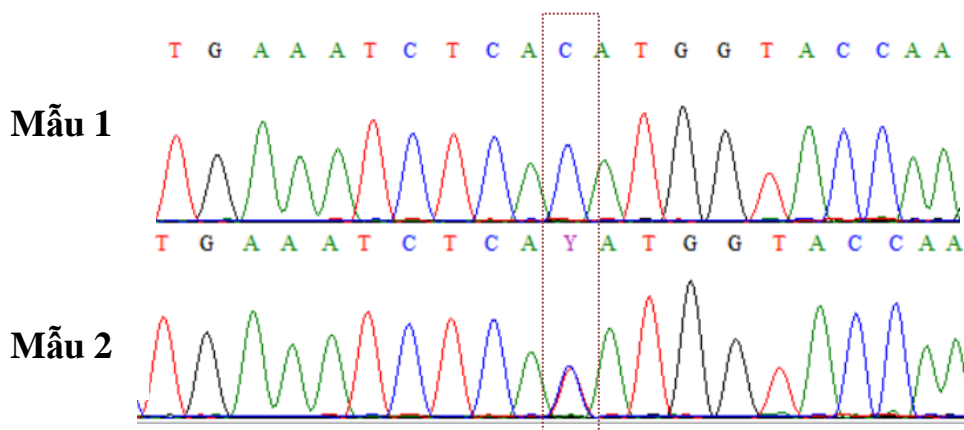
Nhận xét:

- Phân bố kiểu gen *LRP5* rs41494349 trong nhóm nghiên cứu đạt cân bằng định luật Hardy Weinberg.
- Tỷ lệ alen G chỉ chiếm 8%. Có 4 bệnh nhân có kiểu gen GG chiếm 0,7%.

3.2.4. Kiểu gen và alen của đa hình gen *FTO* rs1121980



Hình 3.5. Kết quả xác định kiểu gen *FTO* rs1121980 bằng phương pháp RFLP-PCR



Hình 3.6. Kết quả xác định kiểu gen *FTO* rs1121980 bằng phương pháp giải trình tự gen

Mẫu 1(ID:3140): Tại vị trí SNP xuất hiện một đỉnh chỉ thị loại nucleotide C, tương ứng kiểu gen CC

Mẫu 2(ID:3266): Tại vị trí SNP xuất hiện 2 đỉnh do một nửa alen mang Nucleotid C, một nửa alen mang Nucleotid T, tương ứng kiểu gen CT

Bảng 3.6. Phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *FTO* rs1121980 của đối tượng nghiên cứu

Alen và kiểu gen		<i>FTO</i> rs1121980	
		n = 566	Tỷ lệ (%)
Kiểu gen (n)	CC	395	69,8
	CT	171	30,2
	TT	0	0
Alen (2n)	C	961	84,9
	T	171	15,1
p theo HDW		p < 0,0001	

Giá trị p theo HDW nhận được từ kiểm định Hardy Weinberg.

Nhận xét:

- Phân bố kiểu gen *FTO* rs1121980 trong nhóm nghiên cứu chưa đạt cân bằng định luật Hardy Weinberg.
- Tỷ lệ alen T chỉ chiếm 15,1%. Không có kiểu gen TT trong nhóm nghiên cứu.

3.2.5. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm không loãng xương

Bảng 3.7. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm không loãng xương

Kiểu gen		Loãng xương n=223	Không loãng xương n=343	p
Kiểu gen MTHFR rs1801133				
Kiểu gen n (%)	CC	155 (69,5)	249 (72,6)	0,35
	CT	62 (27,8)	90 (26,2)	
	TT	6 (2,7)	4 (1,2)	
Alen 2n (%)	C	372(83,4)	588(85,7)	0,29
	T	74(16,6)	98(14,3)	
Kiểu gen LRP5 rs41494349				
Kiểu gen n (%)	AA	186 (83,4)	294 (85,7)	0,65
	AG	35 (15,7)	47 (13,7)	
	GG	2 (0,9)	2 (0,6)	
Alen 2n (%)	A	407 (91,3)	635 (92,6)	0,43
	G	39 (8,7)	51(7,4)	
Kiểu gen FTO rs1121980				
Kiểu gen n (%)	CC	159 (71,3)	236 (68,8)	0,59
	CT	64 (28,7)	107 (31,2)	
Alen 2n (%)	C	382 (85,7)	579 (84,4)	0,69
	T	64 (14,3)	107 (15,6)	

Giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương.

3.2.6. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường.

Bảng 3.8. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cổ xương đùi

Cổ xương đùi		BMD bình thường n=222	Giảm BMD n=253	Loãng xương n=91	p
Kiểu gen MTHFR rs1801133					
Kiểu gen n (%)	CC	160(72,1)	176 (69,6)	68 (74,7)	0,10
	CT	62 (27,9)	69 (27,2)	21 (23,1)	
	TT	0 (0,0)	8 (3,2)	2 (2,2)	
Alen 2n (%)	C	382(86,0)	421(83,2)	157(86,3)	0,38
	T	62(14,0)	85(16,8)	25(13,7)	
Kiểu gen LRP5 rs41494349					
Kiểu gen n (%)	AA	190 (85,6)	212 (83,8)	78 (85,7)	0.56
	AG	29 (13,1)	40 (15,8)	13 (14,3)	
	GG	3 (1,3)	1 (0,4)	0 (0,0)	
Alen 2n (%)	A	409(92,1)	464(91,7)	169(92,9)	0,88
	G	35(7,9)	42(8,30)	13(7,1)	
Kiểu gen FTO rs1121980					
Kiểu gen n (%)	CC	154 (69,4)	180 (71,1)	61 (67,0)	0.75
	CT	68 (30,6)	73 (28,9)	30 (33,0)	
Alen 2n (%)	C	376(84,7)	433(85,6)	152(83,5)	0,75
	T	68(15,3)	73(14,4)	30(16,5)	

Giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cổ xương đùi

Bảng 3.9. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí đầu trên xương đùi

Kiểu gen		Đầu trên xương đùi	BMD bình thường n=351	Giảm BMD n=168	Loãng xương n=47	P
Kiểu gen MTHFR rs1801133						
Kiểu gen n (%)	CC		252 (71,8)	118 (70,2)	34 (72,3)	0,68
	CT		95 (27,1)	45 (26,8)	12 (25,5)	
	TT		4 (1,1)	5 (3,0)	1 (2,1)	
Alen 2n (%)	C		599(85,33)	281(83,63)	80(85,11)	0,76
	T		103(14,67)	55(16,37)	14(14,89)	
Kiểu gen LRP5 rs41494349						
Kiểu gen n (%)	AA		298 (84,9)	144 (85,7)	38 (80,9)	0,50
	AG		49 (14,0)	24 (14,3)	9 (19,1)	
	GG		4 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Alen 2n (%)	A		645(91,88)	312(92,86)	85(94,43)	0,72
	G		57(8,12)	24(7,14)	9(9,57)	
Kiểu gen FTO rs1121980						
Kiểu gen n (%)	CC		248 (70,7)	111 (66,1)	36 (76,6)	0,32
	CT		103(29,3)	57 (33,9)	11 (23,4)	
Alen	C		599(85,33)	279(80,04)	83(88,30)	0,32
	T		103(14,67)	57(19,96)	47(11,70)	

Giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí đầu trên xương đùi.

Bảng 3.10. Phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 của nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cột sống thắt lưng

Cột sống thắt lưng		BMD bình thường n=125	Giảm BMD n=239	Loãng xương n=202	P
Kiểu gen					
Kiểu gen MTHFR rs1801133					
Kiểu gen n (%)	CC	90 (72,0)	174 (72,8)	140 (69,3)	0,46
	CT	35 (28,0)	60 (25,1)	57 (28,2)	
	TT	0 (0,0)	5 (2,1)	5 (2,5)	
Alen 2n (%)	C	215(86,00)	408(85,36)	337(83,42)	0,59
	T	35(14,00)	70(14,64)	67(16,58)	
Kiểu gen LRP5 rs41494349					
Kiểu gen n (%)	AA	103 (82,4)	209 (87,4)	168 (83,2)	0,64
	AG	21 (16,8)	29 (12,1)	32 (15,8)	
	GG	1 (0,8)	1 (0,4)	2 (1,0)	
Alen 2n (%)	A	227(90,80)	447(93,51)	368(91,09)	0,30
	G	23(9,20)	31(6,49)	36(8,91)	
Kiểu gen FTO rs1121980					
Kiểu gen n (%)	CC	82(65,6)	165 (69,0)	148 (73,3)	0,32
	CT	43 (34,4)	74 (31,0)	54 (26,7)	
Alen 2n (%)	C	207(82,80)	404(84,52)	350 (86,63)	0,32
	T	43 (17,20)	74 (15,48)	54 (13,37)	

Giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phân bố kiểu gen và alen của đa hình MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương và nhóm giảm mật độ xương so với nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cột sống thắt lưng.

3.3. Môi liên quan giữa tính đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 với mật độ xương và các yếu tố nguy cơ loãng xương

3.3.1. Môi liên quan giữa kiểu gen và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.11. Môi liên quan giữa kiểu gen *MTHFR* rs1801133 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

KGen \ BMD	CC	CT	TT	p	p	P
	(n=404)	(n=152)	(n=10)	(CC-CT)	(CC-TT)	(CT-TT)
CXD (g/cm ²)	0,67 ± 0,12	0,67 ± 0,12	0,58 ± 0,07	0,440	0,046	0,046
ĐTXĐ (g/cm ²)	0,80 ± 0,13	0,80 ± 0,14	0,70 ± 0,09	0,709	0,029	0,029
CSTL (g/cm ²)	0,75 ± 0,14	0,74 ± 0,15	0,71 ± 0,10	0,673	0,226	0,226

Giá trị p nhận được từ kiểm định Independent samples T test

Nhận xét: Kiểu gen TT có mật độ xương thấp hơn kiểu gen CC và CT tại 3 vị trí. Tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở vị trí cổ xương đùi và đầu trên xương đùi ($p < 0,05$).

Bảng 3.12. Môi liên quan giữa kiểu gen *LRP5* rs41494349 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

KGen \ BMD	AA	AG	GG	p	P	P
	(n = 480)	(n = 82)	(n = 4)	(AA-AG)	(AA-GG)	(AG-GG)
CXD (g/cm ²)	0,67 ± 0,12	0,67 ± 0,12	0,73 ± 0,06	0,83	0,39	0,39
ĐTXĐ (g/cm ²)	0,79 ± 0,14	0,79 ± 0,14	0,84 ± 0,03	0,67	0,43	0,43
CSTL (g/cm ²)	0,75 ± 0,14	0,73 ± 0,16	0,77 ± 0,12	0,78	0,78	0,78

Giá trị p nhận được từ kiểm định Independent samples T test

Nhận xét: Kiểu gen GG có xu hướng có mật độ xương cao hơn kiểu gen AG và AA, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Bảng 3.13. Mối liên quan giữa kiểu gen *FTO* rs1121980 và mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

Kiểu gen <i>FTO</i> rs1121980	CC n = 395	CT n = 171	p
BMD cổ xương đùi (g/cm ²)	0,67 ± 0,12	0,66 ± 0,12	0,87
BMD đầu trên xương đùi (g/cm ²)	0,78 ± 0,13	0,79 ± 0,14	0,81
BMD cột sống thắt lưng (g/cm ²)	0,74 ± 0,15	0,77 ± 0,14	0,14

Giá trị p nhận được từ kiểm định Independent samples T test

Nhận xét: Ở vị trí CSTL người có kiểu gen CT có BMD cao hơn người có kiểu gen CC. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

3.3.2. Mối liên quan giữa kiểu gen và các yếu tố nguy cơ loãng xương

Bảng 3.14. Mối liên quan giữa kiểu gen *MTHFR* rs1801133 và các yếu tố nguy cơ loãng xương

Kiểu gen	CC n = 404	CT n = 152	TT n = 10	p
Đặc điểm				
^a Tuổi (năm)	59,5 ± 7,63	59,7 ± 6,88	58,1 ± 5,17	0,78
^a Chiều cao (cm)	151,9 ± 5,66	152,6 ± 5,02	151,5 ± 4,03	0,34
^a Cân nặng (kg)	51,1 ± 7,47	51,7 ± 7,17	50,2 ± 6,02	0,58
^a BMI (kg/m ²)	22,1 ± 2,72	22,2 ± 2,69	21,8 ± 1,80	0,89
^b Tiền sử gãy xương				0,44
Không	362 (89,6)	135 (88,8)	8(80,0)	
Có	42 (10,4)	17 (11,2)	2(20,0)	
^a Tuổi mãn kinh	48,7 ± 3,87	49,4 ± 3,65	49,0 ± 3,02	0,37
^a Số năm mãn kinh	10,8 ± 8,63	10,4 ± 7,97	9,1 ± 5,86	0,97
^a Số con	3,3 ± 1,53	3,3 ± 1,54	2,6 ± 0,69	0,36
^b Hoạt động thể lực (METs-min/week)				0,90
< 600	172 (42,6)	65 (42,8)	5 (50,0)	
>= 600	232 (57,4)	87 (57,2)	5 (50,0)	

a: Các biến tuân theo quy luật phân phối chuẩn được biểu diễn bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, giá trị p nhận được từ kiểm định ANOVA test.

b: Biến phân loại được biểu diễn bằng phần trăm (số lượng), giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test.

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu ở nhóm có kiểu gen CC, CT và TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 (p > 0,05)

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa kiểu gen *LRP5* rs41494349 và các yếu tố nguy cơ loãng xương

Kiểu gen Đặc điểm	AA n = 480	AG n = 82	GG n = 4	p
^a Tuổi (năm)	59,5 ± 7,31	60,1 ± 7,96	58,5 ± 2,89	0,75
^a Chiều cao (cm)	152,1 ± 5,51	151,9 ± 5,30	156,7 ± 3,59	0,22
^a Cân nặng (kg)	51,2 ± 7,18	51,6 ± 8,32	55,3 ± 8,52	0,50
^a BMI (kg/m ²)	22,1 ± 2,66	22,3 ± 2,98	22,4 ± 2,34	0,85
^b Tiền sử gãy xương				0,58
<i>Không</i>	425 (88,5%)	76 (92,7%)	4 (100,0%)	
<i>Có</i>	55 (11,5%)	6 (7,3%)	0 (0,0%)	
^a Tuổi mãn kinh	48,8 ± 3,80	49,4 ± 3,86	48,0 ± 1,41	0,31
^a Số năm mãn kinh	10,6 ± 8,37	10,7 ± 8,83	10,5 ± 2,64	0,85
^a Số con	3,3 ± 1,55	3,12 ± 1,40	3,50 ± 1,00	0,59
^b Hoạt động thể lực (MET-phút/tuần)				0,69
< 600	208 (43,3%)	32 (39,0%)	2 (50,0%)	
≥ 600	272 (56,7%)	50 (61,0%)	2 (50,0%)	

a: Các biến tuân theo quy luật phân phối chuẩn được biểu diễn bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, giá trị p nhận được từ kiểm định ANOVA test.

b: Biến phân loại được biểu diễn bằng phần trăm (số lượng), giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test.

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu ở nhóm có kiểu gen AA, AG và GG của đa hình gen *LRP5* rs41494349 ($p > 0,05$)

Bảng 3.16. Mối liên quan giữa kiểu gen FTO rs1121980 và các yếu tố nguy cơ loãng xương

Đặc điểm	Kiểu gen	CC n=395	CT n=171	p
^a Tuổi (năm)		59,5 ± 7,5	59,6 ± 7,0	0,89
^a Chiều cao (cm)		151,91 ± 5,68	152,53 ± 4,95	0,19
^a Cân nặng (kg)		51,07 ± 7,47	51,79 ± 7,13	0,27
^a BMI (kg/m ²)		22,09 ± 2,67	22,25 ± 2,78	0,52
^b Tiền sử gãy xương				1,00
	<i>Không</i>	352 (89,1%)	153 (89,5%)	
	<i>Có</i>	43 (10,9%)	18 (10,5%)	
^a Tuổi mãn kinh		48,9 ± 3,7	49,0 ± 3,9	0,85
^a Số năm mãn kinh		10,6 ± 8,4	10,6 ± 8,4	0,93
^a Số con		3,3 ± 1,5	3,3 ± 1,6	0,85
^b Hoạt động thể lực (MET-phút/tuần)				0,94
	< 600	168 (42,5%)	74 (43,3%)	
	≥ 600	227 (57,5%)	97 (56,7%)	

a: Các biến tuân theo quy luật phân phối chuẩn được biểu diễn bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, giá trị p nhận được từ kiểm định ANOVA test.

b: Biến phân loại được biểu diễn bằng phần trăm (số lượng), giá trị p nhận được từ kiểm định Chisquare test.

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu ở nhóm có kiểu gen CC và CT của đa hình gen FTO rs1121980 ($p > 0,05$)

3.3.3. Tương quan 2 biến của một số yếu tố nguy cơ với mật độ xương

Bảng 3.17. Tương quan tuyến tính đơn biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương với mật độ xương

Yếu tố \ BMD	CXD Hệ số β [95%CI]	ĐTXĐ Hệ số β [95%CI]	CSTL Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,009 *** [-0,01; -0,008]	-0,010*** [-0,011; -0,009]	-0,010 * [-0,01; -0,008]
CC	0,007*** [0,006; 0,009]	0,009 *** [0,007; 0,01]	0,008 *** [0,006; 0,01]
CN	0,007*** [0,006; 0,008]	0,009 *** [0,008; 0,01]	0,009 *** [0,008; 0,01]
BMI	0,014*** [0,01; 0,017]	0,019 *** [0,015; 0,023]	0,020 *** [0,016; 0,025]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,068 ** [-0,099; -0,036]	-0,07** [-0,11; -0,04]	-0,078** [-0,011; -0,04]
Ở thành thị so với nông thôn	-0,02 [-0,04; 0,002]	-0,02 [-0,05; 0,03]	-0,018 [-0,04; 0,009]
Tuổi mãn kinh	0,004** [0,001; 0,007]	0,005 *** [0,002; 0,008]	0,006 *** [0,003; 0,009]
Số năm sau mãn kinh	-0,008** [-0,009; -0,007]	-0,009 *** [-0,01; -0,007]	-0,008 *** [-0,01; -0,007]
Số con	-0,015 [-0,021; -0,009]	-0,018 [-0,025; -0,010]	-0,02 [-0,03; -0,01]
HĐTL \geq 600 so với <600MET-phút/tuần	0,04 [0,02; 0,06]	0,05 [0,03; 0,07]	0,06 * [0,037; 0,084]
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét:

- Yếu tố tuổi và số năm sau mãn kinh có tương quan nghịch với mật độ xương ($p < 0,001$), tuổi càng cao thì mật độ xương càng giảm, số năm mãn kinh càng tăng thì mật độ xương càng giảm.

- Các yếu tố chiều cao, cân nặng, BMI, tuổi mãn kinh có tương quan thuận với mật độ xương ($p < 0,01$).

- Mật độ xương cao hơn ở nhóm không có tiền sử gãy xương so với nhóm có tiền sử gãy xương ($p < 0,05$).

- Không có sự khác biệt về mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh sống ở nông thôn và thành thị.

3.3.4. Tương quan đa biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương và mật độ xương
Bảng 3.18. Tương quan đa biến của các yếu tố nguy cơ loãng xương và mật độ xương

Yếu tố \ BMD	CXĐ Hệ số β [95%CI]	ĐTXĐ Hệ số β [95%CI]	CSTL Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI	0,012 *** [0,009; 0,015]	0,016 *** [0,013; 0,020]	0,018 *** [0,015; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,034 ** [-0,060; -0,009]	-0,036 ** [-0,064; -0,009]	-0,042 ** [-0,072; -0,011]
Ở thành thị so với nông thôn	-0,012 [-0,030; 0,007]	-0,014 [-0,035; 0,006]	-0,015 [-0,038; 0,007]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
Số con	0,005 [-0,001; 0,010]	0,004 [-0,002; 0,010]	-0,001 [-0,008; 0,006]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET-phút/tuần	0,008 [-0,009; 0,024]	0,009 [-0,008; 0,027]	0,020 * [0,001; 0,040]
n	566	566	566
R ²	0,408	0,447	0,400
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét: Các yếu tố ảnh hưởng đến mật độ xương 3 vị trí sau khi phân tích hồi quy đa biến là: tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, số năm sau mãn kinh. Ở cột sống thắt lưng có thêm yếu tố hoạt động thể lực.

3.3.5. Tương quan tuyến tính đơn biến của các đa hình gen với mật độ xương

Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến trong đó biến phụ thuộc là BMD, biến độc lập là gen để xác định ảnh hưởng của gen tới BMD.

Bảng 3.19. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen MTHFR rs1801133 với mật độ xương

Tương quan		Hệ số β [95%CI] vị trí ĐTXĐ	Hệ số β [95%CI] vị trí CXĐ	Hệ số β [95%CI] vị trí CSTL
Đồng trội				
CC	n = 404	1	1	1
CT	n = 152	0,005 [-0,020; 0,0302]	0,008 [-0,015; 0,031]	-0,005 [-0,033; 0,023]
TT	n = 10	-0,087* [-0,172; -0,002]	-0,071 [-0,147; 0,006]	-0,074 [-0,165; 0,018]
Trội				
CC	n = 404	1	1	1
CT-TT	n = 162	-0,0007 [-0,025; 0,024]	0,003 [-0,019; 0,026]	-0,009 [-0,036; 0,018]
Lặn				
CC-CT	n = 556	1	1	1
TT	n = 10	-0,088* [-0,172; -0,004]	-0,073 [-0,149; 0,003]	-0,072 [-0,164; 0,019]
Siêu trội				
CC-TT	n = 414	1	1	1
CT	n = 152	0,007 [-0,018; 0,0322]	0,01 [-0,013; 0,033]	-0,003 [-0,031; 0,024]
Cộng gộp mỗi alen				
0,1,2	n = 566	-0,007 [-0,029; 0,016]	-0,002 [-0,023; 0,018]	-0,013 [-0,037; 0,012]

Nhận xét: Có mối tương quan tuyến tính đơn biến giữa đa hình gen MTHFR rs1801133 với mật độ xương ở mô hình đồng trội và mô hình lặn tại vị trí đầu trên xương đùi

Bảng 3.20. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương

Tương quan		Hệ số β [95%CI] Tại vị trí đầu trên xương đùi	Hệ số β [95%CI] Tại vị trí cổ xương đùi	Hệ số β [95%CI] Tại vị trí cột sống thắt lưng
Mô hình gen				
Đồng trội				
AA	n = 480	1	1	1
AG	n = 82	-0,009 [-0,040; 0,023]	-0,002 [-0,031; 0,027]	-0,003 [-0,038; 0,032]
GG	n = 4	0,058 [-0,076; 0,191]	0,057 [-0,063; 0,176]	0,033 [-0,111; 0,176]
Trội				
AA	n = 480	1	1	1
AG-GG	n = 86	-0,005 [-0,037; 0,025]	0,001 [-0,028; 0,029]	-0,001 [-0,035; 0,032]
Lặn				
AA-AG	n = 562	1	1	1
GG	n = 4	0,059 [-0,074; 0,192]	0,057 [-0,062; 0,177]	0,033 [-0,11; 0,176]
Siêu trội				
AA-GG	n = 484	1	1	1
AG	n = 82	-0,009 [-0,041; 0,022]	-0,003 [-0,031; 0,026]	-0,003 [-0,038; 0,031]
Cộng gộp mỗi alen				
0,1,2	n = 566	-0,002 [-0,031; 0,027]	0,003 [-0,023; 0,03]	0 [-0,031; 0,032]

Nhận xét: Không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí trong các mô hình gen

**Bảng 3.21. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của đa hình gen
FTO rs1121980 với mật độ xương**

Tương quan		Hệ số β [95%CI] vị trí ĐTXĐ	Hệ số β [95%CI] vị trí CXĐ	Hệ số β [95%CI] vị trí CSTL
Mô hình gen				
<i>Đồng trội</i>				
CC	n = 395	1	1	1
CT	n = 171	0,010 [-0,014; 0,034]	0,005 [-0,018; 0,027]	0,024 [-0,003; 0,05]
<i>Cộng gộp mỗi alen</i>				
0,1,2	n = 566	0,010 [-0,014; 0,034]	0,005 [-0,018; 0,027]	0,024 [-0,003; 0,05]

Nhận xét: Không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *FTO* rs1121980 với mật độ xương ở cả 3 vị trí trong các mô hình gen

3.3.6. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương

Bảng 3.22. Tương quan đa biến giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cổ xương đùi

Yếu tố	Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi		-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,005 *** [-0,007; -0,003]
BMI		0,012 *** [0,009; 0,015]	0,012 *** [0,009; 0,015]
Tiền sử gãy xương so với không		-0,033 ** [-0,058; -0,008]	-0,033 ** [-0,058; -0,008]
Thành thị so với nông thôn		-0,011 [-0,030; 0,007]	-0,011 [-0,030; 0,007]
Số con		0,004 [-0,002; 0,010]	0,004 [-0,002; 0,010]
Số năm sau mãn kinh		-0,004 *** [-0,006; -0,001]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]
HĐTL \geq 600 so với <600MET- phút/tuần		0,007 [-0,009; 0,023]	0,007 [-0,009; 0,023]
<i>MTHFR</i> : CT so với CC		0,007 [-0,010; 0,025]	
<i>MTHFR</i> : TT so với CC		-0,073 * [-0,132; -0,014]	
<i>MTHFR</i> : TT so với CC+CT			-0,075 * [-0,133; -0,016]
n		566	566
R ²		0,415	0,414
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét:

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí cổ xương đùi khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình đồng trội).

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí cổ xương đùi khi so với người mang kiểu gen CC và người mang kiểu gen CT sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình lặn)

Bảng 3.23. Tương quan đa biến giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại đầu trên xương đùi

Yếu tố \ Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
BMI	0,016 *** [0,013; 0,019]	0,016 *** [0,013; 0,019]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,035 * [-0,062; -0,008]	-0,035 * [-0,062; -0,008]
Thành thị so với nông thôn	-0,014 [-0,034; 0,006]	-0,014 [-0,034; 0,006]
Số con	0,004 [-0,003; 0,010]	0,004 [-0,003; 0,010]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET- phút/tuần	0,009 [-0,009; 0,026]	0,009 [-0,009; 0,026]
MTHFR: CT so với CC	0,004 [-0,015; 0,023]	
MTHFR: TT so với CC	-0,089 ** [-0,153; -0,025]	
MTHFR: TT so với CC+CT		-0,090 ** [-0,153; -0,027]
n	566	566
R ²	0,455	0,455

*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.

Nhận xét:

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí đầu trên xương đùi khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình đồng trội).

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí đầu trên xương đùi khi so với người mang kiểu gen CC và người mang kiểu gen CT sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình lặn)

Bảng 3.24. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cột sống thắt lưng

Yếu tố \ Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,003 * [-0,006; -0,000]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI	0,018 *** [0,015; 0,022]	0,018 *** [0,015; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,040 ** [-0,071; -0,010]	-0,040 ** [-0,071; -0,010]
Thành thị so với nông thôn	-0,015 [-0,037; 0,007]	-0,015 [-0,038; 0,007]
Số con	-0,001 [-0,008; 0,006]	-0,001 [-0,008; 0,006]
Số năm sau mãn kinh	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET- phút/tuần	0,020 * [0,000; 0,039]	0,020 * [0,000; 0,039]
MTHFR: CT với CC	-0,007 [-0,028; 0,014]	
MTHFR: TT với CC	-0,076 * [-0,147; -0,005]	
MTHFR: TT với CC+CT		-0,074 * [-0,145; -0,003]
n	566	566
R ²	0,405	0,404
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.		

Nhận xét:

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình đồng trội).

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương vị trí cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC và người mang kiểu gen CT sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác (mô hình lặn).

Bảng 3.25. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cổ xương đùi

Yếu tố	Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi		-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,005 *** [-0,007; -0,003]
BMI		0,012 *** [0,009; 0,015]	0,012 *** [0,009; 0,015]
Tiền sử gãy xương so với không		-0,034 ** [-0,059; -0,009]	-0,034 ** [-0,059; -0,009]
Thành thị so với nông thôn		-0,012 [-0,030; 0,007]	-0,012 [-0,030; 0,007]
Số con		0,005 [-0,001; 0,010]	0,005 [-0,001; 0,010]
Số năm sau mãn kinh		-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET- phút/tuần		0,008 [-0,008; 0,024]	0,008 [-0,008; 0,024]
LRP5: AG với AA		-0,001 [-0,023; 0,021]	
LRP5: GG với AA		0,044 [-0,049; 0,136]	
LRP5: GG với AA+AG			0,044 [-0,049; 0,136]
n		566	566
R ²		0,408	0,408
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét: Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương cổ xương đùi sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

Bảng 3.26. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại đầu trên xương đùi

Yếu tố \ Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
BMI	0,016 *** [0,013; 0,020]	0,016 *** [0,013; 0,020]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,037 ** [-0,064; -0,009]	-0,036 ** [-0,063; -0,009]
Thành thị so với nông thôn	-0,015 [-0,035; 0,006]	-0,015 [-0,035; 0,006]
Số con	0,004 [-0,002; 0,010]	0,004 [-0,002; 0,010]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET- phút/tuần	0,010 [-0,008; 0,027]	0,010 [-0,008; 0,027]
LRP5: AG với AA	-0,009 [-0,033; 0,015]	
LRP5: GG với AA	0,043 [-0,057; 0,143]	
LRP5: GG với AA+AG		0,044 [-0,056; 0,144]
n	566	566
R ²	0,449	0,448
*** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05.		

Nhận xét: Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương đầu trên xương đùi sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

Bảng 3.27. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại cột sống thắt lưng

Yếu tố	Mô hình gen	Mô hình đồng trội Hệ số β [95%CI]	Mô hình lặn Hệ số β [95%CI]
Tuổi		-0,003 * [-0,006; -0,000]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI		0,018 *** [0,015; 0,022]	0,018 *** [0,015 ; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không		-0,042 ** [-0,072; -0,011]	-0,042 ** [-0,072; -0,011]
Thành thị so với nông thôn		-0,015 [-0,038; 0,007]	-0,015 [-0,038; 0,007]
Số con		-0,001 [-0,008; 0,006]	-0,001 [-0,008; 0,006]
Số năm sau mãn kinh		-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET- phút/tuần		0,020 * [0,001; 0,040]	0,020 * [0,001; 0,040]
LRP5: AG với AA		-0,006 [-0,033; 0,021]	
LRP5: GG với AA		0,020 [-0,092; 0,132]	
LRP5: GG với AA+AG			0,021 [-0,091; 0,133]
n		566	566
R ²		0,400	0,400
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét: Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương cột sống thắt lưng sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác

Bảng 3.28. Tương quan đa biến giữa đa hình gen *FTO* rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại 3 vị trí

Yếu tố \ Vị trí	CXĐ Hệ số β [95%CI]	ĐTXĐ Hệ số β [95%CI]	CSTL Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI	0,012 *** [0,009; 0,015]	0,016 *** [0,013; 0,020]	0,018 *** [0,015; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,034 ** [-0,060; -0,009]	-0,036 ** [-0,064; -0,009]	-0,042 ** [-0,072; -0,011]
Thành thị so với nông thôn	-0,012 [-0,030; 0,007]	-0,015 [-0,035; 0,005]	-0,016 [-0,039; 0,006]
Số con	0,005 [-0,001; 0,010]	0,004 [-0,002; 0,010]	-0,001 [-0,008; 0,006]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
HĐTL ≥ 600 so với <600 MET-phút/tuần	0,008 [-0,009; 0,024]	0,009 [-0,008; 0,027]	0,020 * [0,001; 0,040]
<i>FTO</i> : CT với CC	0,003 [-0,013; 0,020]	0,008 [-0,010; 0,027]	0,022 * [0,001; 0,042]
n	566	566	566
R ²	0,408	0,448	0,404
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét:

- Không thấy mối liên quan giữa kiểu gen CT và CC của đa hình gen *FTO* rs1121980 với mật độ xương cổ xương đùi, đầu trên xương đùi sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

- Người mang kiểu gen CT của đa hình gen *FTO* rs1121980 có khả năng tăng mật độ xương cột sống thắt lưng so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

Bảng 3.29. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí (mô hình lặn)

Yếu tố \ Vị trí	CXD Hệ số β [95%CI]	ĐTXĐ Hệ số β [95%CI]	CSTL Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,003 * [-0,006; -0,000]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI	0,012 *** [0,009; 0,015]	0,018 *** [0,015; 0,022]	0,018 *** [0,015; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,033 * [-0,058; -0,008]	-0,040 ** [-0,071; -0,010]	-0,040 ** [-0,071; -0,010]
Thành thị so với nông thôn	-0,011 [-0,030; 0,007]	-0,015 [-0,038; 0,007]	-0,015 [-0,038; 0,007]
Số con	0,004 [-0,002; 0,010]	-0,001 [-0,008; 0,006]	-0,001 [-0,008; 0,006]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
HĐTL \geq 600 so với <600MET-phút/tuần	0,007 [-0,009; 0,023]	0,020 * [0,000; 0,039]	0,020 * [0,000; 0,039]
MTHFR: TT vs CC+CT	-0,075 * [-0,133; -0,016]	-0,074 * [-0,145; -0,003]	-0,074 * [-0,145; -0,003]
LRP5: GG vs AA+AG	0,043 [-0,049; 0,135]	0,020 [-0,092; 0,131]	0,020 [-0,092; 0,131]
n	566	566	566
R ²	0,415	0,404	0,404
*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.			

Nhận xét:

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC và CT sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

- Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

- Không đưa đa hình gen *FTO* rs1121980 vào phân tích ở mô hình lặn vì trong 566 phụ nữ sau mãn kinh được nghiên cứu thì không phát hiện kiểu gen TT của đa hình gen này

Bảng 3.30. Tương quan đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí (mô hình đồng trội)

Yếu tố \ Vị trí	CXD Hệ số β [95%CI]	ĐTXĐ Hệ số β [95%CI]	CSTL Hệ số β [95%CI]
Tuổi	-0,005 *** [-0,007; -0,003]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]	-0,003 * [-0,006; -0,000]
BMI	0,012 *** [0,009; 0,015]	0,016 *** [0,013; 0,019]	0,018 *** [0,015; 0,022]
Tiền sử gãy xương so với không	-0,033 * [-0,058; -0,008]	-0,035 * [-0,062; -0,008]	-0,040 ** [-0,071; -0,010]
Thành thị so với nông	-0,012 [-0,030; 0,007]	-0,015 [-0,035; 0,005]	-0,016 [-0,038; 0,006]
Số con	0,004 [-0,002; 0,010]	0,003 [-0,003; 0,010]	-0,001 [-0,008; 0,006]
Số năm sau mãn kinh	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,004 *** [-0,006; -0,002]	-0,005 *** [-0,008; -0,003]
HĐTL ≥ 600 so với <600MET-phút/tuần	0,007 [-0,009; 0,023]	0,009 [-0,009; 0,026]	0,020 * [0,000; 0,039]
<i>MTHFR</i> : CT vs CC	0,007 [-0,011; 0,024]	0,003 [-0,016; 0,022]	-0,007 [-0,028; 0,014]
<i>MTHFR</i> : TT vs CC	-0,073 * [-0,132; -0,014]	-0,090 ** [-0,154; -0,027]	-0,078 * [-0,150; -0,007]
<i>LRP5</i> : AG vs AA	-0,002 [-0,024; 0,020]	-0,009 [-0,033; 0,015]	-0,006 [-0,033; 0,020]
<i>LRP5</i> : GG vs AA	0,042 [-0,050; 0,134]	0,043 [-0,056; 0,143]	0,027 [-0,084; 0,139]
<i>FTO</i> : CT vs CC	0,005 [-0,012; 0,021]	0,010 [-0,009; 0,028]	0,022 * [0,002; 0,043]
n	566	566	566
R ²	0,416	0,457	0,410

*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.

Nhận xét:

- Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

- Người mang kiểu gen CT của đa hình gen *FTO* rs1121980 có khả năng tăng mật độ xương cột sống thắt lưng so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

- Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1 Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

4.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành trên đối tượng phụ nữ sau mãn kinh là nhóm đối tượng có nguy cơ cao bị loãng xương. Chúng tôi lựa chọn được 566 phụ nữ sau mãn kinh có tuổi từ 44 đến 88 tuổi. Kết quả cho thấy một số đặc điểm chung như sau: tuổi trung bình của đối tượng là $59,6 \pm 7,39$ tuổi, cân nặng trung bình là $51,29 \pm 7,37$ kg, chiều cao trung bình là $152,0 \pm 5,48$ cm, BMI trung bình là $22,13 \pm 2,7$ kg/m², số con trung bình là $3,3 \pm 1,5$ con, tuổi mãn kinh trung bình là $48,9 \pm 3,8$ tuổi, số năm sau mãn kinh trung bình là $10,6 \pm 8,41$ năm. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như kết quả nghiên cứu của Hoàng Văn Dũng và cộng sự (2016) khi khảo sát mật độ xương, các yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ ngoại thành Hà nội¹¹³. Tào Minh Thúy và cộng sự (năm 2013) khảo sát các yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ miền Bắc Việt Nam từ 50 tuổi trở lên cũng cho kết quả tương tự¹¹⁴. Như vậy nhóm đối tượng nghiên cứu của chúng tôi có thể đại diện được cho những phụ nữ sau mãn kinh miền Bắc, Việt nam.

Nghiên cứu của chúng tôi có 75,6% phụ nữ sau mãn kinh sống tại nông thôn và 24,4% phụ nữ sau mãn kinh sống tại thành thị. Chúng tôi chọn tất cả phụ nữ sau mãn kinh đến khám và kiểm tra sức khỏe tại Bệnh viện Bạch Mai với tiêu chuẩn không có các bệnh lý ảnh hưởng đến mật độ xương như đái tháo đường, suy gan, suy thận, bệnh lý tuyến giáp, tiền sử phẫu thuật cắt tử cung-buồng trứng, không dùng các thuốc ảnh hưởng đến mật độ xương như corticoid, thuốc chống loãng xương. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này có một sự chênh lệch về nơi sống của đối tượng nghiên cứu nông thôn nhiều hơn thành thị. Đây có thể là do đặc điểm bệnh nhân đến khám tại Bệnh viện Bạch mai.

Về hoạt động thể lực có 42,8% đối tượng nghiên cứu có tổng hoạt động thể lực < 600 MET - phút/ tuần, 57,2% đối tượng nghiên cứu có tổng hoạt động thể lực \geq 600 MET - phút/ tuần. Trong nghiên cứu tiến hành tại Việt Nam trên 14.706 đối tượng ở nhiều tỉnh, thành phố trong cả nước có độ tuổi 25 - 64 tuổi cho thấy tỷ lệ nữ có tổng hoạt động thể lực ở mức thấp < 600 MET – phút/ tuần là xấp xỉ 40% ở thành thị và 30% ở nông thôn¹¹⁵. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ hoạt động thể lực ở mức thấp cao hơn nghiên cứu này có lẽ do đối tượng nghiên cứu của chúng tôi có tuổi cao hơn.

4.1.2. Đặc điểm mật độ xương của đối tượng nghiên cứu

Mật độ xương của các đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi được khảo sát bằng phương pháp hấp thụ tia X năng lượng kép (DXA) trên máy Hologic tại Bệnh viện Bạch mai. Mật độ xương tại cổ xương đùi là $0,66 \pm 0,12$ (g/cm²), đầu trên xương đùi là $0,79 \pm 0,13$ (g/cm²), cột sống thắt lưng là $0,76 \pm 0,14$ (g/cm²). Nguyễn Thị Thanh Mai (2021) khi khảo sát mật độ xương ở bệnh nhân thoái hóa khớp gối sau mãn kinh cũng cho kết quả tương tự¹¹⁶.

Theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), đánh giá mật độ xương dựa vào chỉ số Tscore. Chỉ số Tscore ≥ -1 là mật độ xương bình thường, $-2,5 < \text{Tscore} < -1$ là giảm mật độ xương, chỉ số Tscore $\leq -2,5$ là loãng xương. Tại mỗi vị trí trên cơ thể có thể cho giá trị BMD và chỉ số Tscore khác nhau. Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo chẩn đoán loãng xương nên dựa vào chỉ số Tscore tại CXĐ. Tuy nhiên, Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng và Hội loãng xương Hoa Kỳ lại khuyến cáo chẩn đoán loãng xương cần phải dựa vào 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL^{108,109}. Phụ nữ sau mãn kinh được chẩn đoán là loãng xương khi chỉ số Tscore $\leq -2,5$ ở ít nhất một trong ba vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL. Kết quả trong 566 đối tượng nghiên cứu của chúng tôi khi dựa theo khuyến cáo của Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng và Hội

loãng xương Hoa Kỳ có 39,4% phụ nữ sau mãn kinh loãng xương và 60,6% phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương. Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của tác giả Marquez và cộng sự năm 2009 ở phụ nữ mãn kinh người Mỹ gốc Việt cũng cho thấy tỉ lệ loãng xương là 37%⁴⁰. Khi tính tỷ lệ loãng xương tại từng vị trí, nghiên cứu của chúng tôi có 35,7% phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại vị trí CSTL, 16,1% phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại vị trí CXĐ, 8,3% loãng xương tại vị trí ĐTXĐ. Kết quả này tương tự của tác giả Nguyễn Thị Thanh Hương (2009)¹¹⁷, Hồ Phạm Thục Lan (2011)¹¹⁸ khi nghiên cứu mật độ xương trên nữ giới đều nhận thấy mật độ xương CSTL cao hơn CXĐ ở mọi lứa tuổi. Sự khác biệt về tỷ lệ loãng xương tại 3 vị trí này có thể lý giải do sự khác biệt về cấu tạo xương ở mỗi vị trí. CSTL có cấu tạo chủ yếu là xương xốp do đó quá trình mất xương xảy ra nhanh hơn.

4.1.3 Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu theo phân loại mật độ xương

**** Tuổi và loãng xương:***

Loãng xương là bệnh thường gặp ở người cao tuổi, đặc biệt phụ nữ sau mãn kinh. Nhiều nghiên cứu chứng tỏ tuổi càng cao mật độ xương càng giảm. Ở người già chức năng của tạo cốt bào bị suy giảm làm mất cân bằng giữa tạo xương và hủy xương, sau mỗi một chu chuyển xương cân bằng âm thiết lập giữa hủy xương lớn hơn tạo xương dần dần dẫn đến giảm khối lượng xương, tăng tổn thương vi cấu trúc của xương, xương bị loãng, giảm tính chịu lực dẫn đến dễ gãy xương⁴⁶. Hơn thế nữa ở người già có sự suy giảm hấp thụ canxi - vitamin D ở ruột, giảm tái hấp thu canxi - vitamin D ở ống thận, giảm tổng hợp vitamin D là yếu tố nguy cơ tăng tỉ lệ loãng xương ở người cao tuổi¹¹⁹. Nghiên cứu của Dương Thanh Bình năm 2018 trên phụ nữ sau mãn kinh đến khám tại Bệnh viện hữu nghị Việt nam – Cu ba, Đồng Hới cho thấy tuổi là yếu tố tương quan nghịch với mật độ xương⁴⁸.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi của đối tượng nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) ở nhóm loãng xương so với nhóm không loãng xương. Tuổi trung bình ở nhóm loãng xương là 63,88 tuổi. Tuổi trung bình ở nhóm không loãng xương là 56,75 tuổi.

** Chiều cao, cân nặng, BMI và mật độ xương:*

Chiều cao là yếu tố có ảnh hưởng đến mật độ xương. Những người tầm vóc nhỏ có khối xương thấp hơn nên dễ có nguy cơ loãng xương¹²⁰. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy chiều cao trung bình nhóm phụ nữ tham gia nghiên cứu là $152,0 \pm 5,48$ cm. Có mối tương quan tuyến tính thuận giữa chiều cao và mật độ xương. Theo kết quả nghiên cứu của Tào Minh Thúy ở phụ nữ trên 50 tuổi, người có chiều cao dưới 145 cm có nguy cơ mắc bệnh loãng xương cao hơn 3,8 lần so với người cao từ 145 cm trở lên, kết quả có ý nghĩa thống kê (95%CI: 1,022-2,534, $p < 0,05$)¹¹⁴. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chiều cao của đối tượng nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) giữa nhóm loãng xương so với nhóm không loãng xương. Chiều cao trung bình ở nhóm loãng xương là 150,38 cm. Chiều cao trung bình ở nhóm không loãng xương là 153,21 cm.

Ở những phụ nữ nhẹ cân sự mất xương xảy ra nhanh hơn và tần suất gãy cổ xương đùi và xẹp đốt sống do loãng xương cao hơn. Ngược lại cân nặng cao là một yếu tố bảo vệ cơ thể khỏi tình trạng mất xương thông qua việc tăng tạo xương và tăng chuyển androgen tuyến thượng thận thành estrogen ở mô mỡ¹²¹. Theo De Laet C và cộng sự cho thấy BMI ≥ 25 là yếu tố bảo vệ đối với BMD, trong khi ở những người gầy với BMI $< 18,5$ là yếu tố nguy cơ tăng loãng xương, người có BMI < 20 bất kể tuổi, giới có liên quan tới mất xương nhiều và tăng nguy cơ gãy xương gấp 1 - 2 lần so với người có BMI ≥ 25 ¹²⁰. Theo nghiên cứu của Tào Minh Thúy người có cân nặng dưới 42 kg có nguy cơ mắc bệnh loãng xương cao hơn 6,2 lần so với người có cân nặng từ 42

kg trở lên với OR: 6,2 (95% CI: 2,317-16,387, $p < 0,001$), có mối tương quan giữa loãng xương với chỉ số khối cơ thể ở ngưỡng dưới 18,5 với OR: 4,4 (95%CI:1,603 -11,906, $p < 0,01$)¹¹⁴. Theo kết quả của Hoàng Thị Bích và cộng sự ở đối tượng phụ nữ trên 50 tuổi đều nhận thấy yếu tố nguy cơ loãng xương như: cân nặng thấp dưới 42 kg OR: 22,9 (95%CI: 5,57 ÷ 94,06, $p < 0,01$), BMI thấp dưới 18,5 với OR: 5,4 (95%CI: 1,86 ÷ 7,2, $p < 0,05$)⁴⁹, Trong nghiên cứu của chúng tôi, cân nặng của đối tượng nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) ở nhóm loãng xương so với nhóm không loãng xương. Cân nặng trung bình ở nhóm loãng xương là 47,68 kg. Cân nặng trung bình ở nhóm không loãng xương là 53,63 kg. BMI cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương.

* Tuổi mãn kinh, số năm sau mãn kinh và mật độ xương

Mãn kinh là tình trạng ngừng chu kỳ kinh nguyệt ở nữ giới do suy giảm chức năng buồng trứng theo sinh lý. Những phụ nữ mãn kinh sớm (trước 45 tuổi, tự nhiên hay do phẫu thuật cắt bỏ buồng trứng) có nguy cơ loãng xương cao hơn nhóm chưa mãn kinh. Tốc độ mất xương ở phụ nữ sau mãn kinh cao hơn ở nam giới cùng tuổi, tốc độ này là 0,5 - 1,5%/ năm, thậm chí lên tới đỉnh 5 - 10%/năm giai đoạn sau 5 năm mãn kinh, trong khi của nam giới là 0.4%/năm^{46,47}.

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tuổi mãn kinh trung bình ở nhóm phụ nữ nghiên cứu là $48,9 \pm 3,8$ tuổi. Ở Trung Quốc, tuổi mãn kinh trung bình của phụ nữ thành phố là 49,5 tuổi; ở phụ nữ nông thôn là 47,5 tuổi^{112,113}.

Sự thay đổi cơ bản ở thời kỳ mãn kinh là sự thay đổi về hormone sinh dục, ở giai đoạn này hormone FSH tăng cao và estradiol giảm thấp. Đây là nguyên nhân của hầu hết các triệu chứng lâm sàng. Cơ chế tác động của estrogen lên mật độ xương rất phức tạp, ngày nay nhờ tiến bộ của y học phân tử đã làm sáng tỏ vai trò của estrogen tích cực lên mật độ xương thông qua

những tác động chính như: tác động ức chế sự hủy xương thông qua vai trò của OPG ức chế yếu tố RANKL, từ đó ức chế hoạt động của hủy cốt bào; tác động tăng tạo xương thông qua tăng biệt hóa tạo cốt bào, tăng thời gian hoạt động của tạo cốt bào; tăng tổng hợp chất nền collagen khung xương; kích thích hoạt động của enzym 1,25(OH)₂D₁α - hydroxylase để tăng tổng hợp vitamin D₃ hoạt động, từ đó tăng hấp thụ canxi... Tất cả những cơ chế trên đều tác động đến chu chuyển xương, estrogen là một trong số hormon điều hòa tính ổn định của chu chuyển xương, khi estrogen giảm đi đáng kể (giai đoạn mãn kinh) làm cho chu chuyển xương tăng lên dẫn đến tốc độ mất xương tăng lên, tăng tỉ lệ loãng xương và tăng nguy cơ gãy xương^{122,124}. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi mãn kinh và số năm sau mãn kinh của đối tượng nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm loãng xương so với nhóm không loãng xương. Tuổi mãn kinh trung bình ở nhóm loãng xương là 48,08 tuổi. Tuổi mãn kinh trung bình ở nhóm không loãng xương là 49,49 tuổi. Số năm sau mãn kinh ở nhóm loãng xương là 15,81 năm. Số năm sau mãn kinh ở nhóm không loãng xương là 7,27 năm.

*Nơi sống và mật độ xương

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mật độ xương ở 2 nhóm phụ nữ sau mãn kinh sống ở nông thôn và thành thị. Phụ nữ nông thôn có thể có điều kiện ăn uống không tốt bằng phụ nữ sống tại thành thị nhưng phụ nữ sống tại nông thôn thường có thời gian hoạt động ngoài trời nhiều hơn phụ nữ sống tại thành thị.

*Hoạt động thể lực và mật độ xương

Hoạt động thể lực là một yếu tố giúp ngăn ngừa loãng xương bằng cách tăng sức mạnh cơ và xương, kích thích sự hình thành xương và tăng mật độ khoáng xương. Ở người lớn tuổi hoạt động thể lực ít tác động cơ học đến xương hơn¹²⁵. Sundus Tariq và cộng sự (2016) tiến hành nghiên cứu trên 167 phụ nữ mãn kinh chia thành 2 nhóm có hoạt động thể lực mức độ trung bình

và nhẹ rồi tiến hành so sánh. Kết quả cho thấy hoạt động thể lực có liên quan đáng kể đến các thông số của xương. Tscore cao hơn đáng kể ở những phụ nữ sau mãn kinh hoạt động thể lực vừa phải so với những phụ nữ sau mãn kinh hoạt động thể lực nhẹ¹²⁶.

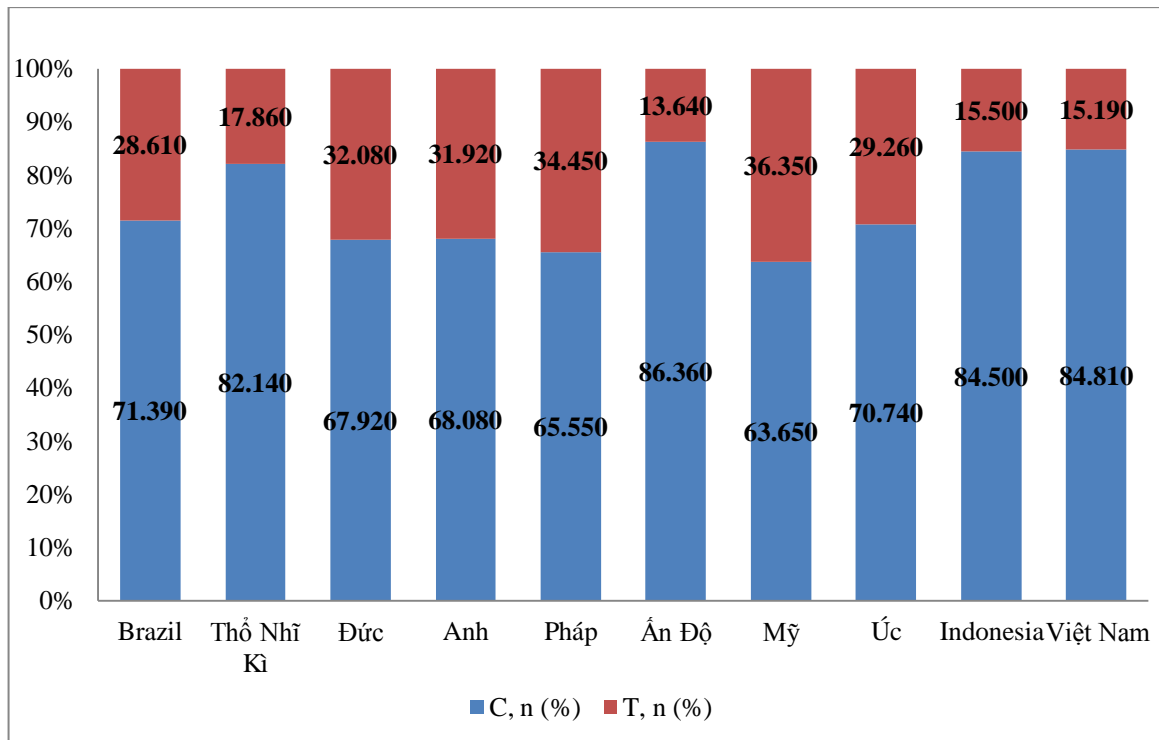
Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hoạt động thể lực có tác động lên khối lượng và mật độ xương, hoạt động thể lực có tương quan thuận với mật độ xương của phụ nữ sau mãn kinh¹²⁷. Việc cải thiện hoạt động thể lực kết hợp với dinh dưỡng hợp lý có thể giúp thúc đẩy quá trình khoáng hoá xương không chỉ ở trẻ nhỏ mà còn ở người cao tuổi¹²⁸.

Theo khuyến cáo của WHO mức hoạt động thể lực cần đạt được với một người trưởng thành bình thường là 600 MET- phút/tuần¹¹⁵. Trong nghiên cứu của chúng tôi mật độ xương ở những phụ nữ sau mãn kinh không đạt mức hoạt động thể lực theo khuyến cáo thấp hơn những người hoạt động đạt mức khuyến cáo có ý nghĩa thống kê ở cả 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ và CSTL. Kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Lành phụ nữ sau mãn kinh không hoạt động thể lực có nguy cơ loãng xương cao hơn so với người hoạt động thể lực (OR:13,1;95%CI: 6,8-26,8; p <0,001).

4.2. Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 tuân theo định luật cân bằng Hardy Weinberg (p > 0,05). Điều này chứng tỏ phân bố kiểu gen và tỷ lệ alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 được di truyền ổn định từ thế hệ này sang thế hệ khác và không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố đặc biệt liên quan đến quá trình tiến hóa. Tỉ lệ kiểu gen và alen của đa hình gen *FTO* rs1121980 chưa tuân theo định luật cân bằng Hardy Weinberg (p < 0,05). Trong 566 phụ nữ sau mãn kinh được nghiên cứu không phát hiện kiểu gen đồng hợp tử lặn TT của đa hình gen *FTO* rs1121980.

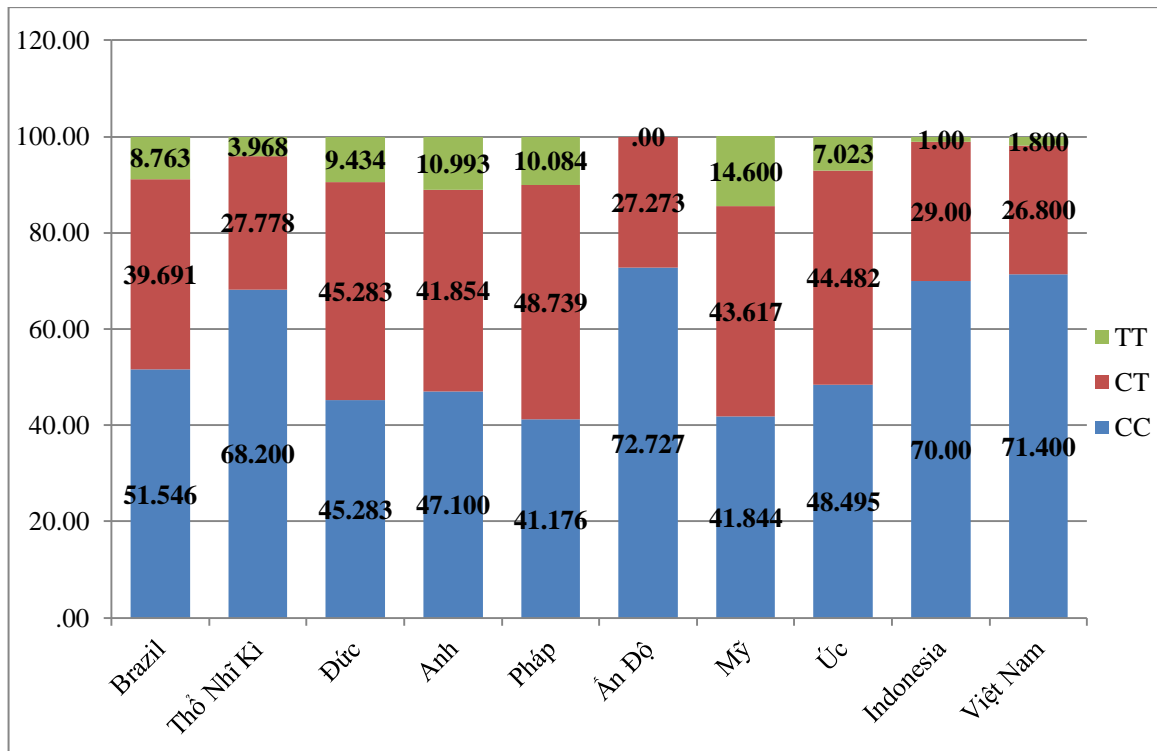
4.2.1. Bàn luận về phân bố tần số alen của đa hình gen *MTHFR rs1801133*



Biểu đồ 4.1. Tần số alen C và T của đa hình *MTHFR rs1801133* ở một số cộng đồng

Trong nghiên cứu của chúng tôi tần số alen C là 84,8%, tần số alen T là 15,2%. Kết quả phân bố alen rất giống với kết quả nghiên cứu ở phụ nữ sau mãn kinh Indonesia tần số alen C là 84,5%, tần số alen T là 15,5%⁸¹. Kết quả này cũng tương tự cộng đồng người Ấn Độ và Thổ Nhĩ Kỳ^{129,130}. Tuy nhiên cộng đồng người da trắng ở châu Âu (Anh, Pháp, Đức, Bosnia), Mỹ, Braxin và Úc.... có tỷ lệ alen T khoảng 29,3 - 36,4%^{131,132,133,134,135,136,137}. Chúng tộc Indonesia là người Đông Nam Á da vàng có vị trí địa lý gần Việt Nam nên rất có tương đồng về di truyền với Việt nam. Ấn Độ là một quốc gia tại Nam Á, Thổ Nhĩ Kỳ có phần lớn tại lãnh thổ tại Tây Á và một phần Đông Nam Âu. Hai quốc gia này có phân bố tần số alen tương tự người Việt Nam. Các cộng đồng thuộc các châu lục khác như Châu Âu, Châu Mỹ, Châu Úc có tỷ lệ alen T cao hơn nghiên cứu của chúng tôi

4.2.2. Bàn luận về phân bố kiểu gen của đa hình gen *MTHFR rs1801133*

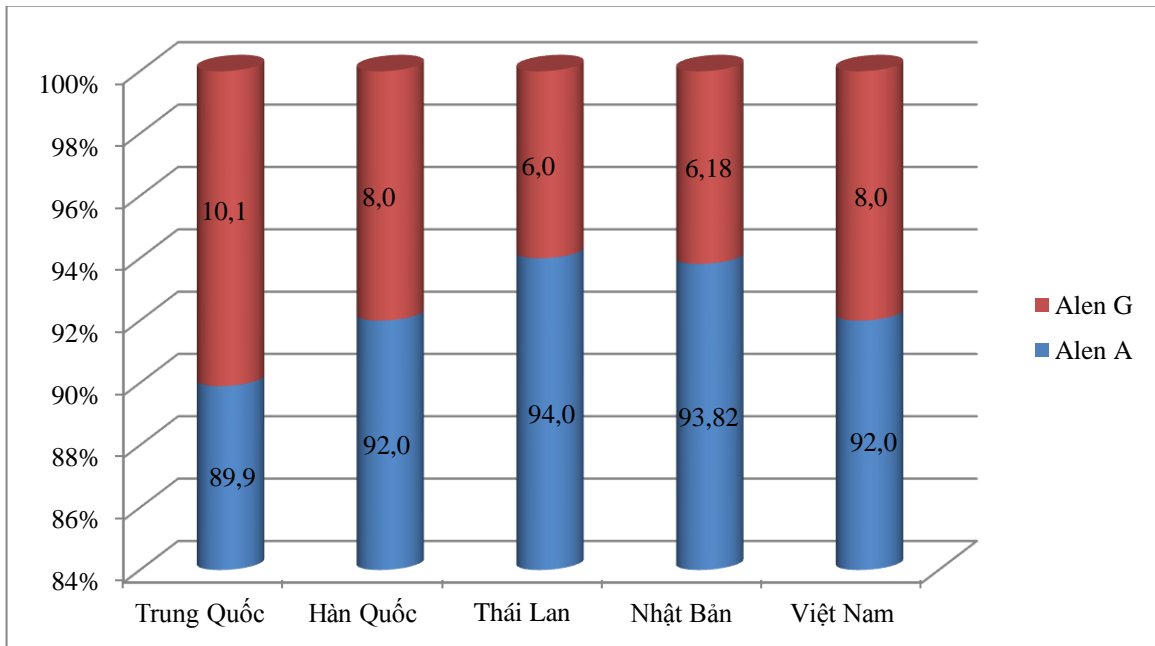


Biểu đồ 4.2. Sự phân bố kiểu gen của đa hình *MTHFR rs 1801133* ở một số cộng đồng

Tương tự như phân bố alen, kết quả phân bố kiểu gen của chúng tôi cũng tương tự người Indonesia, Ấn Độ và Thổ Nhĩ Kỳ. Tuy nhiên, kiểu gen TT của chúng tôi có tỷ lệ thấp hơn các cộng đồng Châu Âu, Châu Úc, Châu Mỹ. Việt Nam, Indonesia, Ấn Độ đều nằm trong khu vực Châu Á, Thổ Nhĩ Kỳ có phần lớn tại lãnh thổ tại Tây Á nên có thể có chung nguồn gốc tổ tiên, hoặc cũng có thể do vị trí địa lý gần nhau nên dân cư ở các nước này dễ dàng di cư sang các vùng lân cận, kết hôn và tạo nên sự giao thoa về mặt di truyền. Do vậy, sự phân bố kiểu gen và tần số alen tương tự như nhau và khác so với người Châu Âu, Châu Úc, Châu Mỹ.

4.2.3. Bàn luận về sự phân bố tần số alen của đa hình gen *LRP5 rs41494349*.

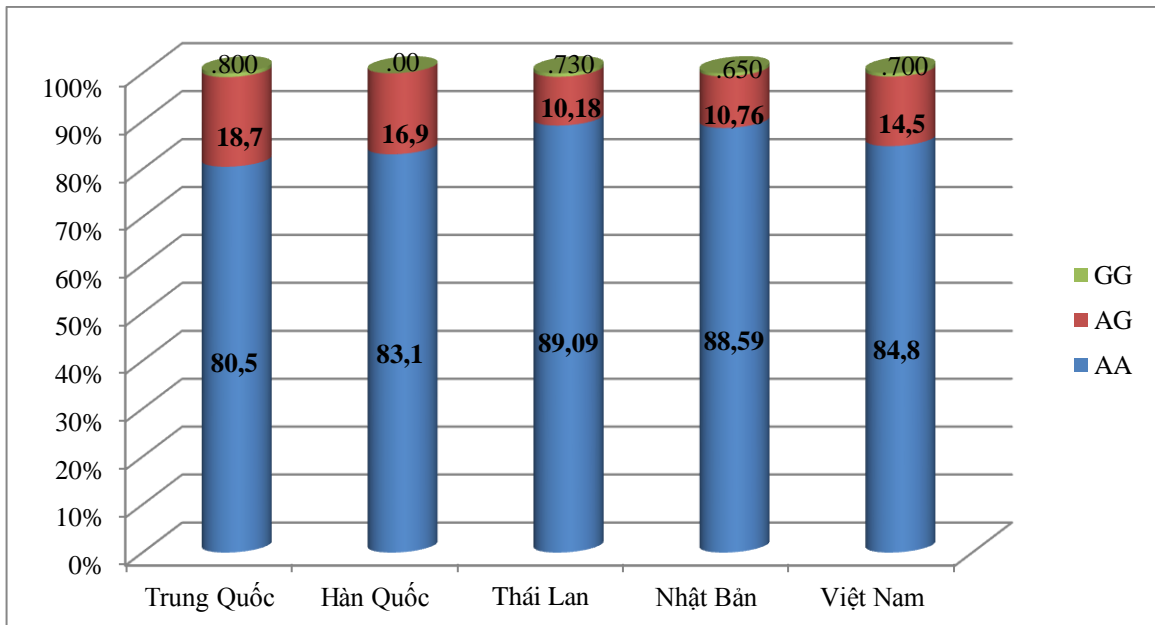
Tần số alen và kiểu gen trong nghiên cứu của chúng tôi tuân theo định luật cân bằng Hardy Weinberg.



Biểu đồ 4.3. Tần số alen A và G của gen *LRP5* rs41494349 ở một số cộng đồng

Tần số alen G của gen *LRP5* tại SNP rs41494349 trong nghiên cứu của chúng tôi là 8,0%. Kết quả này cũng tương tự với tần số alen G của người Nhật Bản (6,18%), Thái Lan (6%), Hàn Quốc (8%), Trung Quốc (10,1%).

4.2.4. Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen của đa hình gen *LRP5* rs41494349.



Biểu đồ 4.4. Sự phân bố kiểu gen của đa hình gen *LRP5* rs41494349 ở một số cộng đồng

Nghiên cứu của chúng tôi bước đầu khảo sát sự phân bố đa hình kiểu gen *LRP5* tại SNP rs41494349 ở phụ nữ mãn kinh Việt Nam trong độ tuổi từ 44-88. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân bố đa hình kiểu gen ở nhóm phụ nữ mãn kinh là AA (84,8%), AG (14,5%), GG (0,7%).

Như vậy tỉ lệ kiểu gen của chúng tôi tương tự như phân bố kiểu gen trong nghiên cứu của Zhen-lin ZANG, Jung- Min Koh, Anong kitjaroentham, Yoichi Ezura nghiên cứu trên người Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan và Nhật Bản^{15,16,18}.

4.2.5 Bàn luận về phân bố tần số kiểu gen và alen của đa hình gen *FTO* rs1121980

Bảng 4.1. So sánh tần số alen và kiểu gen của đa hình gen *FTO* rs1121980 với các nghiên cứu khác

Tác giả	Quốc gia	Chủng tộc (n)	Tỉ lệ alen (%)		Tỉ lệ kiểu gen trong quần thể (%)		
			C	T	CC	CT	TT
Bích Trần et al. (2013) ¹⁵	Úc	Da trắng (n= 778)	57,2	42,8	33,3	47,7	19,0
Gaurav Garg et al. (2014) ¹⁰⁴	Thụy Điển	Da trắng (n ₁ =1061)	54,0	46,0	29,0	50,0	21,0
		(n ₂ =1044)	57,5	42,5	32,0	51,0	17,0
Nghiên cứu này	Việt Nam	Da vàng (n=566)	84,9	15,1	69,8	30,2	0

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ alen C là 84,9%, alen T là 15,1%, tỷ lệ kiểu gen CC là 69,8%, kiểu gen CT là 30,2% và không có cá thể có kiểu gen TT. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với kết quả nghiên cứu trên cộng đồng châu Úc và Thụy Điển. Tại cộng đồng người Úc tỷ lệ alen T là 42,8%, tỷ lệ kiểu gen TT là 19,0%¹⁵. Tại cộng đồng Thụy Điển tỷ lệ alen T là 46,0% và 42,5%, tỷ lệ kiểu gen TT là 21,0% và 17,0%¹⁰⁴.

4.2.6 Bàn luận về phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương.

- Bảng 3.7 trình bày về phân bố kiểu gen và alen của 3 đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương. Trong 566 phụ nữ sau mãn kinh được lựa chọn nghiên cứu có 223 phụ nữ sau mãn kinh bị loãng xương và 343 phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương. Về phân bố kiểu gen và alen ở nhóm loãng xương. Đối với đa hình gen *MTHFR* rs1801133, tỷ lệ% kiểu gen CC/CT/TT là 69,5/27,8/2,7 và tỷ lệ% alen C/T là 83,4/16,6. Đối với đa hình gen *LRP5* rs41494349, tỷ lệ% kiểu gen AA/AG/GG là 83,4/15,7/0,9 và tỷ lệ% alen A/G là 91,3/8,7. Đối với đa hình gen *FTO* rs1121980, tỷ lệ% kiểu gen CC/CT là 71,3/28,7 và tỷ lệ% alen C/T là 85,7/14,3. Không có sự khác biệt về phân bố kiểu gen và alen của 3 đa hình gen này ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương và nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương. Ở đây, chúng tôi phân nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương hay không loãng xương dựa theo khuyến cáo của Hiệp hội quốc tế về đo mật độ xương lâm sàng và Hội loãng xương Hoa Kỳ, phụ nữ sau mãn kinh được chẩn đoán loãng xương khi chỉ số Tscore $\leq -2,5$ ở cổ xương đùi hoặc đầu trên xương đùi hoặc cột sống thắt lưng^{108,109}. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với kết quả nghiên cứu của Masataka Shiraki⁹ và Xiao-Chen⁷⁸. Năm 2008, Masataka Shiraki và cộng sự nghiên cứu trên 502 phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản cho kết quả phụ nữ mang kiểu gen TT của đa hình *MTHFR* rs1801133 có tỷ lệ mắc bệnh loãng xương cao hơn người không mang kiểu gen TT⁹.

Năm 2020, Xiao-Chen và cộng sự đã tổng hợp 7 nghiên cứu bệnh chứng trên phụ nữ Trung Quốc, Mexico và Thái Lan cho kết quả những người mang alen T của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh loãng xương so với những người không mang alen T⁷⁸. Vì vậy, chúng tôi sẽ phân tích sâu hơn nữa bằng việc so sánh sự phân bố kiểu gen và alen của 3 đa hình gen này ở nhóm loãng xương, giảm mật độ xương và mật độ xương bình thường tại mỗi vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng. Theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới, chỉ số Tscore ≥ -1 là mật độ xương bình thường, $-2,5 < \text{Tscore} < -1$ là giảm mật độ xương, chỉ số Tscore $\leq -2,5$ là loãng xương.

4.2.7 Bàn luận về phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường tại vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng

Tổng hợp ba bảng 3.8, 3.9, 3.10 chúng tôi thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sự phân bố kiểu gen và alen của ba đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở nhóm loãng xương so với nhóm giảm mật độ xương và nhóm mật độ xương bình thường. Đối với đa hình gen *MTHFR* rs1801133 sự phân bố tần số kiểu gen CC/CT/TT tại vị trí cổ xương đùi trong nhóm bệnh nhân loãng xương là 74,7%/23,1%/2,2%, sự phân bố tần số alen C/T ở phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại vị trí cổ xương đùi là 86,3%/13,7%. Ở hai vị trí cột sống thắt lưng và đầu trên xương đùi, số liệu cũng thể hiện tương tự. Đối với đa hình gen *LRP5* rs41494349 sự phân bố tần số kiểu gen AA/AG/GG ở phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại cổ xương đùi là 85,7%/14,3%/0,0%, sự phân bố tần số alen A/G ở phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại vị trí cổ xương đùi là 92,9%/7,1%. Đối với đa hình gen *FTO* rs1121980 sự phân bố tần số kiểu gen CC/CT ở phụ nữ sau mãn

kinh loãng xương tại cổ xương đùi là 67,0%/33,0%, sự phân bố tần số alen C/T ở phụ nữ sau mãn kinh loãng xương tại cổ xương đùi là 83,5%/16,5%.

Mặc dù ba đa hình gen chúng tôi lựa chọn để tiến hành nghiên cứu này là ba đa hình gen đã được chứng minh có ảnh hưởng đến chuyển hóa xương thông qua các cơ chế sinh lý học. Đa hình *MTHFR* rs1801133 đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có ảnh hưởng đến mật độ xương, loãng xương và gãy xương trên người châu Âu⁷, châu Á⁹, châu Mỹ⁷⁰, châu Úc⁷². Đa hình gen *LRP5* rs41494349 có ảnh hưởng đến mật độ xương trên người Hàn Quốc¹¹, Nhật Bản¹², Trung Quốc¹³. Đa hình gen *FTO* rs1121980 có ảnh hưởng đến chuyển hóa xương trên người Úc¹⁵. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy tần suất phân bố kiểu gen và alen tại nhóm loãng xương so với nhóm giảm mật độ xương cũng như nhóm loãng xương so với nhóm bình thường là không có sự khác biệt. Điều này có nghĩa là không tìm thấy mối liên quan giữa tính đa hình của 3 gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 với bệnh loãng xương khi tính theo chỉ số Tscore ở phụ nữ sau mãn kinh người Việt nam. Câu hỏi đặt ra là vậy ba đa hình gen chúng tôi đã chọn làm gen ứng viên để thực hiện nghiên cứu này chẳng lẽ lại không ảnh hưởng gì đến chuyển hóa xương của người Việt. Để trả lời câu hỏi này chúng tôi sẽ đi tìm mối liên quan giữa tính đa hình của ba gen này với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh. Có thể ba đa hình gen này ảnh hưởng đến chuyển hóa xương và mật độ xương nhưng mức độ thay đổi mật độ xương chưa đủ nhiều để có sự khác biệt giữa nhóm loãng xương và không loãng xương.

4.3. Mối liên quan giữa tính đa hình của một số gen với mật độ xương và một số yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh

4.3.1. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương.

Bảng 3.11 thể hiện mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương. Ở cổ xương đùi trong số 566 bệnh nhân nghiên cứu có 404 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CC có BMD trung bình là

0,67±0,12 g/cm², 152 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CT có BMD trung bình 0,67±0,12 g/cm², 10 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen TT có BMD trung bình là 0,58±0,07g/cm². Ở đầu trên xương đùi 404 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CC có BMD trung bình là 0,8±0,13g/cm², 152 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CT có BMD trung bình 0,8±0,14g/cm², 10 phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen TT có BMD trung bình là 0,8±0,09g/cm². Ở cột sống thắt lưng, phụ nữ mang kiểu gen CC có BMD trung bình là 0,75±0,14g/cm², phụ nữ mang kiểu gen CT có BMD trung bình là 0,74±0,15g/cm², phụ nữ mang kiểu gen TT có BMD trung bình là 0,71±0,1g/cm². Phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen TT có BMD thấp hơn kiểu gen CC và CT tại cả ba vị trí. Tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở cổ xương đùi và đầu trên xương đùi (p<0,05). Mặc dù alen T được coi là alen nguy cơ ảnh hưởng đến BMD, người mang kiểu gen dị hợp tử CT hoạt tính enzym MTHFR giảm xuống 30%-40% nhưng chúng tôi thấy nhóm có kiểu gen CT có BMD tương tự nhóm có kiểu gen CC, chỉ có sự khác biệt giá trị BMD ở nhóm có kiểu gen đồng hợp tử lặn TT so với nhóm có kiểu gen CC và CT. Theo nhiều báo cáo, người mang kiểu gen đồng hợp tử lặn TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 làm hoạt tính enzym MTHFR giảm 70% so với người mang kiểu gen CC^{10,64}.

4.3.2. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương.

Trong số 566 phụ nữ sau mãn kinh nghiên cứu có 480 đối tượng mang kiểu gen AA có mật độ xương tại CXĐ/ĐTXĐ/CSTL lần lượt là 0,67±0,12 / 0,79±0,14 / 0,75±0,11 (g/cm²). 82 đối tượng mang kiểu gen AG có BMD tương ứng tại CXĐ/ĐTXĐ/CSTL lần lượt là 0,67±0,12 / 0,79±0,14 / 0,73±0,16 (g/cm²). 4 đối tượng mang kiểu gen GG có BMD tại CXĐ/ĐTXĐ/CSTL lần lượt là 0,73±0,06 / 0,84±0,03 / 0,77±0,12 (g/cm²). Chúng tôi thấy giá trị BMD ở nhóm có kiểu gen AA và AG là tương tự nhau.

Nhóm có kiểu gen GG có giá trị BMD trung bình cao hơn hai nhóm AA và AG. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

4.3.3. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *FTO* rs1121980 với mật độ xương.

Đối với đa hình kiểu gen *FTO* rs1121980, 395 phụ nữ mang kiểu gen CC có BMD tại CXĐ/ĐTXĐ/CSTL lần lượt là $0,67 \pm 0,12$ / $0,78 \pm 0,13$ / $0,74 \pm 0,15$ (g/cm^2), 171 phụ nữ mang kiểu gen CT có BMD tại CXĐ/ĐTXĐ/CSTL lần lượt là $0,66 \pm 0,12$ / $0,79 \pm 0,14$ / $0,77 \pm 0,14$ (g/cm^2). Chúng tôi thấy ở cột sống thắt lưng, giá trị BMD của nhóm có kiểu gen CT lớn hơn kiểu gen CC tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Tóm lại qua tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình kiểu gen với mật độ xương, chúng tôi thấy có sự khác biệt mật độ xương có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen TT với kiểu gen CC, giữa kiểu gen TT với kiểu gen CT của đa hình *MTHFR* rs1801133 tại vị trí cổ xương đùi và đầu trên xương đùi. Vì có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến mật độ xương nên khi xem xét mối liên quan giữa gen và mật độ xương, chúng tôi cần tìm hiểu liệu các gen này có ảnh hưởng đến các nguy cơ loãng xương khác như tuổi, cân nặng, chiều cao, BMI, tuổi mãn kinh, số năm sau mãn kinh, số con, hoạt động thể lực hay không. Chúng tôi phân tích bảng 3.14, 3.15, 3.16, chúng tôi không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các đa hình gen này với các yếu tố nguy cơ loãng xương. Bảng 3.17 cho thấy giữa các nhóm có kiểu gen CC, CT, TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 không có sự khác biệt về tuổi, chiều cao, cân nặng, BMI, tiền sử gãy xương, tuổi mãn kinh, số năm sau mãn kinh, số con, hoạt động thể lực. Kết quả cũng tương tự đối với đa hình kiểu gen *LRP5* rs41494349 và đa hình kiểu gen *FTO* rs1121980. Vì vậy, chúng tôi cho rằng kiểu gen và các yếu tố trên là các yếu tố nguy cơ độc lập ảnh hưởng đến mật độ xương và chúng tôi sẽ đưa vào các mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến, mô hình hồi quy tuyến tính đa biến để phân tích ảnh hưởng của các yếu tố nguy cơ độc lập này tới mật độ xương.

4.3.4. Tương quan tuyến tính đơn biến và đa biến giữa một số yếu tố nguy cơ với mật độ xương.

Trong mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến chúng tôi thấy các yếu tố có tương quan thuận với mật độ xương là chiều cao, cân nặng, BMI, tuổi mãn kinh, hoạt động thể lực. Các yếu tố có tương quan nghịch với mật độ xương là tuổi, số năm sau mãn kinh, tiền sử gãy xương, số con. Yếu tố nơi sống không có sự tương quan tới mật độ xương.

Trong mô hình hồi quy tuyến tính đa biến, chúng tôi thấy các yếu tố liên quan với mật độ xương cổ xương đùi và đầu trên xương đùi là tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, số năm sau mãn kinh. Ở cột sống thắt lưng, ngoài các yếu tố trên còn có yếu tố hoạt động thể lực.

4.3.5. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen MTHFR rs1801133 với mật độ xương

Bảng 3.19 trình bày các số liệu về mối liên quan giữa kiểu gen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương ở 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL với các mô hình giả định để phân tích như sau:

- Mô hình đồng trội: Kiểu gen CT và TT được coi là có ảnh hưởng đối với mật độ xương và được phân tích riêng khi so sánh với kiểu gen bình thường CC làm tham chiếu. Kết quả cho thấy kiểu gen TT có ảnh hưởng đến mật độ xương ở vị trí ĐTXĐ với hệ số β [95%CI] là -0,087[-0,172; -0,002], $p < 0,05$.

- Mô hình trội: Trong mô hình này, nhóm người mang alen T (gồm kiểu gen CT và TT) được giả định là có ảnh hưởng với mật độ xương và được so sánh với nhóm người không mang alen T (kiểu gen CC). Kết quả cho thấy không có mối tương quan có ý nghĩa thống kê về mật độ xương giữa nhóm người mang alen T và nhóm người không mang alen T.

- Mô hình lặn: Trong mô hình này chỉ những người có kiểu gen đồng hợp tử TT được giả định có ảnh hưởng với mật độ xương, còn các kiểu gen khác là CT và CC được giả định không có ảnh hưởng với mật độ xương được

gộp chung vào một nhóm. Kết quả cho thấy người có kiểu gen TT có ảnh hưởng đến mật độ xương so với người có kiểu gen CT và CC với hệ số β [95%CI] là -0,088[-0,172; -0,004], $p < 0,05$.

- Mô hình siêu trội: Trong mô hình này kiểu gen CT được coi là có ảnh hưởng đối với mật độ xương còn kiểu gen CC và TT được coi là không có ảnh hưởng với mật độ xương được xếp chung vào một nhóm. Kết quả cho thấy không có mối tương quan có ý nghĩa thống kê về mật độ xương giữa nhóm người có kiểu gen CT so với nhóm người có kiểu gen CC và TT.

- Mô hình cộng gộp mỗi alen: Trong mô hình này, alen T được giả định có ảnh hưởng đối với mật độ xương và mức độ ảnh hưởng tăng theo số lượng alen T có trong kiểu gen. Kết quả cho thấy không có mối tương quan có ý nghĩa thống kê về mật độ xương ở mô hình này.

4.3.6. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen LRP5 rs41494349 với mật độ xương

Bảng 3.23 trình bày các số liệu về mối liên quan giữa kiểu gen của các đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL với mô hình đồng trội, mô hình trội, mô hình lặn, mô hình siêu trội và mô hình cộng gộp với mỗi alen. Chúng tôi chưa thấy có mối liên quan giữa các kiểu gen và alen của đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương tại cả 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL ở tất cả các mô hình phân tích gen.

4.3.7. Mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến của các đa hình gen FTO rs1121980 với mật độ xương

Trong nghiên cứu của chúng tôi ở 566 phụ nữ sau mãn kinh chúng tôi không thấy có kiểu gen TT của đa hình gen *FTO* rs1121980. Vì vậy ở mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến chúng tôi chỉ phân tích được ở mô hình đồng trội và mô hình cộng gộp alen. Chúng tôi chưa thấy có mối liên quan giữa các kiểu gen và alen của đa hình *FTO* rs1121980 với mật độ xương tại cả 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL ở hai mô hình phân tích gen này.

4.3.8. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.

Dựa vào kết quả của các mô hình hồi quy tuyến tính đơn biến, chúng tôi đã phân tích hồi quy tuyến tính đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs 1801133 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương tại 3 vị trí CXĐ, ĐTXĐ, CSTL ở các mô hình đồng trội, mô hình lặn.

Sự liên quan giữa gen *MTHFR* với hoạt tính enzym *MTHFR* được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1972, khi Mudd và cộng sự phát hiện sự giảm sút nghiêm trọng enzym *MTHFR* ở bệnh nhân homocystinuria, một bệnh di truyền rối loạn chuyển hóa methionine. Từ đó đến nay trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về đa hình gen *MTHFR* rs1801133 để tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình gen này với các bệnh lý tim mạch, đái tháo đường typ II, ung thư đại tràng, ung thư máu, ung thư tuyến giáp, bệnh tự kỷ ở trẻ em và chứng sảy thai liên tiếp.

Ở Việt Nam, khi tìm hiểu mối liên quan về gen với bệnh tật thì đa hình gen *MTHFR* rs1801133 là một trong số các đa hình gen được nghiên cứu nhiều nhất vì đa hình gen này có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính enzym *MTHFR*, một trong những enzym quan trọng nhất trong chu trình chuyển hóa folate. Kiểu gen TT của đa hình gen này tạo ra enzym hoạt tính bằng 30% so với kiểu gen CC. Kiểu gen CT của đa hình gen này tạo ra enzym hoạt tính bằng 65% so với kiểu gen CC^{10,64}. Sự giảm enzym hoạt tính dẫn đến giảm tạo ra sản phẩm 5-methylen tetra hydrofolate và do vậy làm tăng nồng độ homocysteine máu. Nồng độ homocysteine máu cao là nguyên nhân của nhiều bệnh lý mạn tính trong đó có loãng xương⁵⁹. Trong nghiên cứu của chúng tôi, người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở cả ba vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến mật độ xương như tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, khu

vực sống, số con, số năm sau mãn kinh, hoạt động thể lực. Cụ thể tại cổ xương đùi, người mang kiểu gen TT có nguy cơ giảm mật độ xương $0,073 \text{ g/cm}^2$ so với người có kiểu gen CC, tại đầu trên xương đùi, người mang kiểu gen TT có nguy cơ giảm $0,089 \text{ g/cm}^2$ và tại cột sống thắt lưng người mang kiểu gen TT có nguy cơ giảm $0,076 \text{ g/cm}^2$ so với người mang kiểu gen CC. Khi phân tích mối liên quan giữa gen và các yếu tố nguy cơ loãng xương ở mô hình lặn, người mang kiểu gen TT làm giảm $0,075 \text{ g/cm}^2$ mật độ xương tại cổ xương đùi, giảm $0,090 \text{ g/cm}^2$ mật độ xương tại đầu trên xương đùi và giảm $0,074 \text{ g/cm}^2$ mật độ xương tại cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC và CT. Mật độ xương của người mang kiểu gen CT và người mang kiểu gen CC không có sự khác biệt. Mặc dù theo lý thuyết kiểu gen CT làm giảm 30% hoạt tính enzym MTHFR nhưng có thể sự thay đổi này chưa đủ để tạo ảnh hưởng lên chuyển hóa xương vì quá trình chuyển hóa xương chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố.

Tóm lại trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự biệt có ý nghĩa thống kê về sự phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 ở nhóm loãng xương và nhóm không loãng xương, chẩn đoán loãng xương dựa theo chỉ số Tscore. Tuy nhiên, người mang kiểu gen đồng hợp tử lặn TT của đa hình gen này có nguy cơ giảm BMD tại cả 3 vị trí khảo sát là CXĐ, ĐTXĐ và CSTL.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi giống với kết quả nghiên cứu của Bo Abrahamsen trên phụ nữ Đan Mạch, Robert R McLean trên người Mỹ, Aniel Jessica Leticia Brambila – Jabia trên người Mexico, Zhu trên người Úc, Masataka Shirada trên người Nhật Bản.

Bo Abrahamsen và cộng sự (2003) nghiên cứu trên 1748 phụ nữ Đan Mạch mãn kinh chỉ ra người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ bị giảm mật độ xương tại CSTL, CXĐ, ĐTXĐ so với người mang kiểu gen CC và TT, ở giai đoạn sớm sau mãn kinh. Sau 5 năm

điều trị liệu pháp hormon thay thế thì người mang kiểu gen TT vẫn bị giảm mật độ xương tại vị trí đầu trên xương đùi. Trong nghiên cứu này kiểu gen TT chiếm 8,7%⁷.

Robert R. McLean và cộng sự (2004) nghiên cứu 1632 đối tượng là cư dân thị trấn Framingham, bang Massachusetts, Mỹ. Những người tham gia được định lượng về nồng độ folate trong huyết thanh và xác định tính đa hình *MTHFR* rs1801133. Kết quả xác định có mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TT của *MTHFR* rs1801133 và mật độ xương phụ thuộc vào nồng độ folat huyết thanh. Người mang kiểu gen TT có mật độ xương thấp hơn người không mang kiểu gen CT và CC⁷⁰.

Năm 2012, Aniel Jessica Leticia Brambila – Jabia và cộng sự nghiên cứu trên 71 bệnh nhân viêm khớp dạng thấp Mexico cho kết quả những người có kiểu gen đồng hợp tử TT có BMD thấp hơn những người có kiểu gen dị hợp tử CT và cả 2 nhóm này có BMD thấp hơn những người có kiểu gen đồng hợp tử CC⁷⁵.

Zhu và cộng sự (2008) thực hiện một nghiên cứu thuần tập trên 1213 phụ nữ Australia có tuổi từ 70 đến 85 tìm thấy mối liên hệ giữa nồng độ homocystein máu cao do đa hình gen *MTHFR* rs1801133 gây giảm mật độ xương đùi nhưng không làm tăng nguy cơ gãy xương⁷².

Masataka Shiraki và cộng sự (2008) nghiên cứu trên 502 phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản cho thấy người mang kiểu gen TT có tỷ lệ mắc bệnh loãng xương và gãy xương cao hơn người không mang kiểu gen TT⁹.

Bên cạnh đó một số nghiên cứu phân tích tổng hợp cũng tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* rs 1801133 với mật độ xương.

Wang và cộng sự (2011) phân tích 20 nghiên cứu với 3525 bệnh nhân và 17909 đối tượng thuộc nhóm chứng cho thấy sự tương quan mức độ nhẹ giữa *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương CXĐ, CSTL, ĐTXĐ và toàn bộ cơ thể ở người Đông Á⁷⁴.

Năm 2016, Hong – Zhuo Li và cộng sự phân tích tổng hợp 21 nghiên cứu trên 33.045 đối tượng cho thấy đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có liên quan với BMD cổ xương đùi ở phụ nữ sau mãn kinh, ở người da trắng và ở nam giới. Khi phân tích tổng hợp 22 nghiên cứu trên 32271 đối tượng nhóm tác giả cũng cho thấy có sự liên quan giữa đa hình gen này với BMD cột sống thắt lưng ở phụ nữ sau mãn kinh⁷⁷.

Năm 2020, Xiao-Chen và cộng sự đã tổng hợp 7 nghiên cứu bệnh chứng trên phụ nữ Trung Quốc, Mexico và Thái lan, tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 với nguy cơ loãng xương. Kết quả chỉ ra rằng những người có alen T đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh loãng xương trong mô hình đồng trội kiểu gen TT so với kiểu gen CC (OR = 2,36, 95%CI:1,81 – 3,08, $p < 0,05$), mô hình trội kiểu gen TT và CT so với kiểu gen CC (OR=1,47, 95%CI: 1,21 – 1,77, $p < 0,05$), mô hình lặn kiểu gen TT so với kiểu gen CC và CT (OR = 2,16, 95%CI: 1,71 – 2,74, $p < 0,05$)⁷⁸.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với kết quả nghiên cứu của Soewarlan, W.D.H.P và cộng sự nghiên cứu trên 100 đối tượng phụ nữ sau mãn kinh Indonesia không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* rs1801133 với mật độ xương⁸¹. Có sự khác biệt này có thể do nghiên cứu này có đối tượng nghiên cứu nhỏ chỉ 100 phụ nữ sau mãn kinh nên kết quả này chưa đủ để đại diện cho cộng đồng dân cư Indonesia.

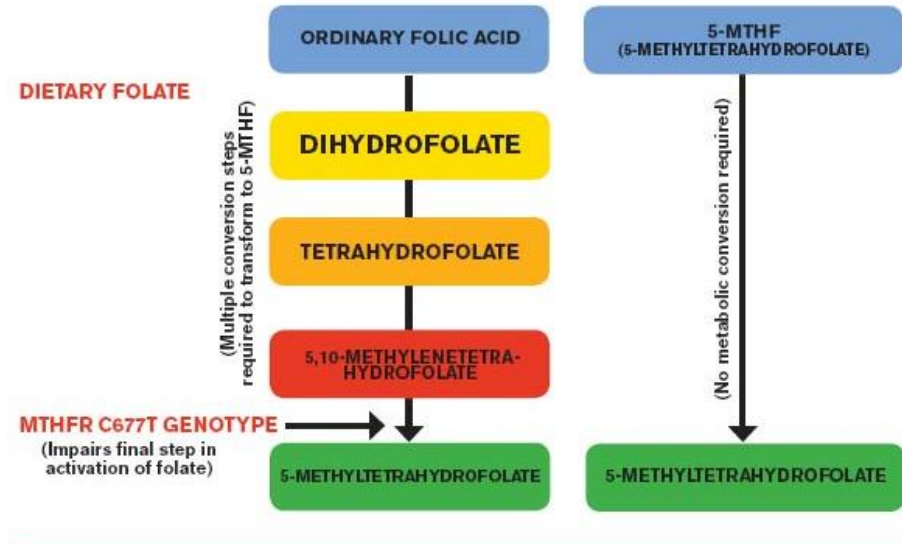
Mặc dù nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ alen T và kiểu gen TT thấp hơn các cộng đồng Châu Âu, Châu Mỹ, Châu Úc nhưng kết quả của chúng tôi về ảnh hưởng của kiểu gen đồng hợp tử lặn TT đến BMD vẫn tương tự phần lớn các nghiên cứu trên thế giới. Người mang kiểu gen TT có nguy cơ bị giảm mật độ xương so với người mang kiểu gen CC và CT.

Đa hình *MTHFR* rs1801133 liên quan tới tình trạng chuyển hóa homocystein do vậy khi mang kiểu gen đồng hợp tử lặn TT sẽ gây tình trạng ứ trệ làm tăng nồng độ homocystein trong máu⁶⁵.

Những người mang kiểu gen TT dẫn tới làm suy giảm chức năng enzym MTHFR gây giảm chuyển hóa acid folic thành 5 – methyl tetrahydrofolat dẫn tới tăng nồng độ homocystein máu. Nồng độ homocystein máu cao sẽ ảnh hưởng đến quá trình tái mô hình xương, quá trình hủy xương lớn hơn quá trình tạo xương dẫn đến giảm mật độ xương⁶⁶. Bên cạnh đó, nồng độ homocystein máu cao ức chế hệ enzym tạo liên kết ngang Lox, điều hòa tăng hoạt động các enzyme cần thiết cho sự methyl hóa DNA di truyền ngoài gen (Cytosine-5) – methyltransferases và helicase đặc hiệu lymphoid làm giảm khả năng tái tạo xương⁶⁸. Homocystein máu cao còn ảnh hưởng đến mạng lưới collagen của xương dẫn đến giảm sức mạnh của xương⁶⁹. Do vậy biện pháp hữu hiệu để làm giảm nguy cơ loãng xương ở những người mang kiểu gen TT là kiểm soát tốt nồng độ homocystein máu.

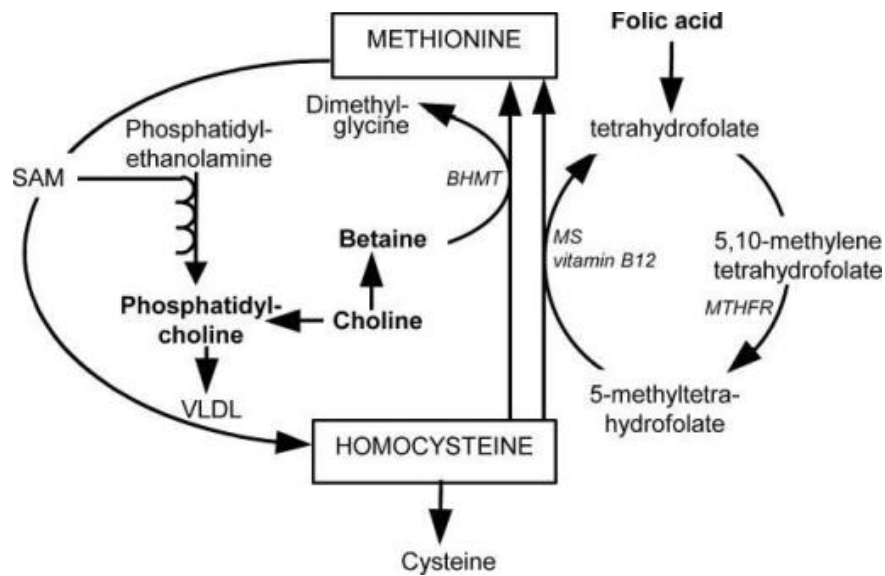
Homocystein được chuyển hóa thành methionine thông qua xúc tác của 5 - methyl tetrahydrofolat và coenzyme vitamin B12. Vì vậy để làm giảm nồng độ homocystein máu người ta cần bổ sung vitamin B12, acid folic hoặc folate cho những bệnh nhân này. Acid folic là chất tổng hợp và không có trong tự nhiên. Khi bổ sung acid folic, acid folic nhanh chóng chuyển thành dihydrofolate (DHF) rồi tetra hydrofolate (THF) dưới tác dụng của enzyme dihydrofolate reductase (DHFR). Nhờ enzyme methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MHFD1), THF lại chuyển thành 5,10 - methylene tetrahydrofolate (5,10 - MTHF). 5,10 - MTHF chuyển thành 5 - MTHF thông qua tác dụng enzyme MTHFR. Chính 5 - MTHF xúc tác cho quá trình chuyển hóa homocystein thành methionine. Do đó làm giảm nồng độ homocystein máu^{138,139}. Quá trình trên chỉ được diễn ra khi hoạt tính enzyme MTHFR bình thường. Người mang kiểu gen CT của đa hình *MTHFR* rs1801133 hoạt tính enzyme MTHFR giảm 30% - 40%, người mang kiểu gen TT của đa hình *MTHFR* rs1801133 hoạt tính enzyme giảm 70%^{140,141}. Khi bổ sung acid folic

cho những bệnh nhân này sẽ làm ứ đọng 5,10 - MTHF do hoạt tính enzyme MTHFR giảm nên 5,10 - MTHF không chuyển hóa thành 5-MTHF. Không có sự xúc tác 5 - MTHF, homocystein không chuyển hóa thành methionine nên không làm giảm nồng độ homocystein máu. Với lý do trên những bệnh nhân mang kiểu gen TT và CT của đa hình *MTHFR* rs1801133 nói riêng và bệnh nhân có hoạt tính enzym MTHFR giảm nói chung, chúng ta nên bổ sung folate hoặc 5 - MTHF thay vì acid folic. Khi đó folate sẽ chuyển hóa theo 3 con đường thành DHF, 5,10 - MTHF và 5 - MTHF. 5 - MTHF sinh ra sẽ chuyển hóa homocystein thành methionine, từ đó làm giảm nồng độ homocystein máu¹³⁸. Như vậy, với bệnh nhân mang kiểu gen CC của đa hình *MTHFR* rs1801133, chúng ta có thể bổ sung acid folic hoặc folate nhưng với những bệnh nhân mang kiểu gen TT và CT của đa hình *MTHFR* rs1801133 thì chỉ được bổ sung folate hoặc 5 - MTHF.



Hình 4.1. Quá trình chuyển hóa acid folic và folat

(http://www.lifeextension.com/~media/lef/images/magazine/mag2009/images/2009_aug2009_homocystine_10-big.ashx)



Hình 4.2. Quá trình chuyển hóa Homocystein

(Nguồn https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/102/1140947/PMC1140947_pmed.0020_35.g001.png)

Folat được biết đến như một nhóm các chất khác nhau có thể tìm thấy trong tự nhiên dưới các dạng:

- Dihydrofolate
- Methylfolate
- Monoglutamin folate
- Polyglutamin folate

Folat còn có nhiều trong các loại thực phẩm như các loại hạt đậu (đậu tương, đậu đen, đậu xanh,...) quả bơ, súp lơ xanh, trái cây họ cam, gan động vật (gan gà, gan vịt,...), lòng đỏ trứng,....

Do vậy, để giảm nồng độ homocystein máu nhằm dự phòng loãng xương cần bổ sung vitamin B12 và 5 - methyl tetrahydrofolate cho bệnh nhân có kiểu gen CT hoặc TT hoặc nồng độ homocystein máu cao để tăng cường chuyển hóa homocystein thành methionin.

Chúng tôi đưa ra bảng 4.2 thể hiện hàm lượng folat trong các loại thực phẩm để giúp những bệnh nhân có nồng độ homocystein cao tham khảo điều chỉnh chế độ dinh dưỡng,

Bảng 4.2. Hàm lượng folat trong 100 gam phần ăn được của một số thực phẩm

Tên thực phẩm (100g)	Hàm lượng folat (μg)	Tên thực phẩm (100g)	Hàm lượng folat (μg)
Đậu đen	444	Ổi	49
Đậu đũa	633	Cam	30
Đậu tương	375	Bơ vỏ xanh	35
Đậu xanh	625	Gan gà	588
Cải cúc	177	Gan vịt	738
Cải xanh	187	Lòng đỏ trứng	146
Rau muống	194	Mộc nhĩ	160

(Nguồn: Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam – Viện dinh dưỡng)

4.3.9. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.

Đối với đa hình gen *LRP5* rs41494349, chúng tôi không thấy mối liên quan giữa đa hình gen này với mật độ xương tại 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng sau khi đã kiểm soát yếu tố nguy cơ: tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, nơi sống, số con, số năm sau mãn kinh, hoạt động thể lực ở 2 mô hình lựa chọn phân tích là mô hình đồng trội và mô hình lặn.

- Protein liên quan đến thụ thể lipoprotein (*LRP5*) là một thành viên của họ thụ thể lipoprotein có trọng lượng phân tử thấp, là một protein được tiết ra trong nhiều mô và tế bào như mô vú, mô xương, tế bào nội mô và tế bào gốc. *LRP5* có ảnh hưởng rất lớn đến con đường truyền tín hiệu Wnt, liên quan chặt chẽ đến sự điều hòa phát triển của xương bằng cách ảnh hưởng đến mật độ xương⁸⁵. Bệnh loãng xương (OPPG) có đặc điểm khối lượng xương thấp, gãy

xương ở trẻ em và giảm thị lực đã được chứng minh là do mất chức năng của gen đối với thụ thể LRP5⁸⁶. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho rằng đột biến (G171V) trong gen *LRP5* có liên quan đến khối lượng xương cao⁸⁹. Gần đây nhiều nghiên cứu đã xác định đa hình gen *LRP5* rs41494349 có ảnh hưởng đến mật độ xương. Tuy nhiên mức độ liên quan của đa hình gen này với mật độ xương ở các chủng tộc là không đồng nhất. Nghiên cứu của chúng tôi có kết quả tương tự nghiên cứu của Anong Kitjaroen Than (2016) nghiên cứu trên 277 phụ nữ sau mãn kinh Thái Lan đã không tìm thấy mối liên quan giữa SNP Q89R (rs41494349) với mật độ xương D⁹⁴.

- Nghiên cứu của chúng tôi khác với nghiên cứu của Tomohiko Urano (2007) trên 357 phụ nữ sau mãn kinh Nhật Bản thấy rằng đối tượng không có alen R (QQ, n=321) có điểm số hình thành loãng xương thấp hơn đáng kể các đối tượng có ít nhất một alen R¹². Zhen-lin Zang (2005) nghiên cứu trên 647 phụ nữ sau mãn kinh Trung Quốc cho thấy SNP Q89R của gen *LRP5* có liên quan đáng kể với mật độ xương cổ xương đùi cả trước và sau khi điều chỉnh các yếu tố nguy cơ tuổi, số năm sau mãn kinh, chiều cao, cân nặng¹³. Jung-Min Koh, Min Hui Jung và cộng sự (2003) nghiên cứu 219 nam 20-34 tuổi ở Hàn Quốc nhận thấy *LRP5* rs41494349 có liên quan đến BMD cổ xương đùi và tam giác Ward. Những người có alen R có BMD tại 2 vị trí này thấp hơn những người không có alen R¹¹. Gen *LRP5* nằm trên nhánh dài của NST số 11 gồm 23 exon tác động kích thích hoạt động tạo cốt bào làm tăng mật độ xương thông qua con đường tín hiệu Wnt. Đột biến làm tăng hoạt động gen *LRP5* làm tăng mật độ xương. Đột biến làm giảm hoạt động gen *LRP5* làm giảm mật độ xương. SNP Q89R (rs 41494349) nằm ở vị trí exon 2 của gen *LRP5* có sự thay thế nucleotid A thành G ở vị trí 314 đã được tìm thấy ở quần thể người châu Á nhưng rất hiếm gặp trên người da trắng.

4.3.10. Tương quan tuyến tính đa biến của đa hình gen *FTO* rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương.

- Trong mô hình hồi quy tuyến tính đa biến, chúng tôi không thấy mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *FTO* rs1121980 với mật độ xương tại vị trí cổ xương đùi và đầu trên xương đùi. Tuy nhiên, tại vị trí cột sống thắt lưng, người mang kiểu gen dị hợp tử CT của đa hình gen *FTO* rs1121980 lại làm tăng mật độ xương so với kiểu gen đồng hợp tử trội CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố: tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, nơi sống, tiền sử sản khoa, hoạt động thể lực. Cụ thể: người mang kiểu gen CT làm tăng mật độ xương thêm $0,022\text{g/cm}^2$ so với người mang kiểu gen CC.

Nghiên cứu của chúng tôi khác với nghiên cứu của Gauraw Garg và cộng sự năm 2014 khi nghiên cứu trên 1044 phụ nữ Thụy Điển có tuổi trung bình là 75 và 1061 phụ nữ trẻ Thụy Điển có tuổi trung bình là 25 đã không thấy có mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *FTO* rs1121980 với mật độ xương hay gãy xương¹⁰⁴. Năm 2013, Bích Trần và cộng sự đã phát hiện ra đa hình gen *FTO* rs1121980 có liên quan đến gãy xương ở người Úc da trắng. Những phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử lặn TT có nguy cơ gãy cổ xương đùi cao hơn 2,06 lần so với những phụ nữ có kiểu gen đồng hợp tử trội CC¹⁵.

Năm 2011, Yan Guo và cộng sự đã tìm thấy có mối liên quan của 6 SNP (rs 16952955, rs 2540766, rs2540784, rs 16952951, rs12447427, rs 2689247) nằm ở intron 8 của gen *FTO* với mật độ xương cổ xương đùi ở người Trung Quốc. Mỗi alen nhỏ của mỗi SNP làm tăng mật độ xương cổ xương đùi với hệ số β tương ứng là 0,025 và 0,015 ở 2 nhóm 818 và 809 người Trung Quốc. Tuy nhiên không có SNP nào trong 6 SNP này cho thấy mối liên quan với mật độ xương của người da trắng⁹⁷.

Năm 2015, Jianmin Xu và cộng sự nghiên cứu trên 108 bệnh nhân loãng xương và 93 đối chứng đã cho thấy đa hình gen *FTO* rs7206790 có liên quan

đến bệnh loãng xương. Người mang kiểu gen đồng hợp tử lặn của đa hình này có nguy cơ mắc bệnh loãng xương tăng lên (OR = 3,238; 95% CI 1,112 – 9,427; p=0,025)¹⁴².

Yếu tố di truyền có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh. Rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng một sự thay đổi nhỏ của gen có thể gây ra sự khác biệt đáng kể mật độ khoáng xương và nguy cơ loãng xương. SNP là sự thay đổi nhỏ phổ biến nhất của gen¹⁴².

Tổng hợp 2 nghiên cứu trên người Trung Quốc, chúng tôi thấy mỗi SNP của gen *FTO* có ảnh hưởng khác nhau đến xương. Trong khi SNP rs 7206790 làm tăng nguy cơ mắc bệnh loãng xương thì 6 SNP nằm ở intron 8 của gen *FTO* lại làm tăng mật độ xương cổ xương đùi cùng ở quần thể người Trung Quốc.

Trong nghiên cứu của Bích Trần và cộng sự năm 2013, alen T được xem như alen nguy cơ của gãy xương thì trong nghiên cứu của chúng tôi alen T được xem như yếu tố bảo vệ với mật độ xương tại vị trí cổ xương đùi. Đây có thể là cùng một kiểu gen nhưng ở các môi trường sống khác nhau, các dân tộc khác nhau thì lại có ảnh hưởng khác nhau tới loãng xương. Loãng xương và béo phì đều là những bệnh lý có rối loạn đa yếu tố có chung nhiều yếu tố rủi ro về di truyền và môi trường có liên hệ với nhau thông qua một số con đường điều tiết phức tạp. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng trọng lượng cơ thể tăng có liên quan tích cực tới khối lượng xương trong khi trọng lượng cơ thể thấp là một yếu tố nguy cơ gây mất xương và loãng xương. Tác động tích cực của trọng lượng cơ thể lên khối lượng xương có thể do một số yếu tố: tải trọng cơ học tăng lên có tác dụng đồng hóa trên xương, chuyển đổi tiền chất steroid thành estrogen ở mô mỡ ngoại vi hoặc thông qua việc bài tiết các hormon hoạt tính của xương từ tế bào beta tuyến tụy và chính tế bào mỡ¹⁰⁴.

Năm 2012 nhóm nghiên cứu của Trần Quang Bình đã công bố kết quả nghiên cứu về mối liên quan của SNP rs 9939609 ở intron 1 của gen FTO đến béo phì ở trẻ nội thành Hà Nội. kết quả alen A của SNP rs 9939609 liên quan đến béo phì ở các mô hình giả định¹⁴³.

Năm 2020, Đỗ Nam Khánh, Trần Quang Bình đã công bố một nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của SNP rs 9939609 ở cả 3 mô hình di truyền trội, đồng trội và siêu trội với nguy cơ béo phì ở trẻ mầm non Hà Nội. SNP rs 9939609 và rs 1121980 cùng nằm trên intron 1 của gen *FTO* nên có liên quan mật thiết với nhau¹⁴⁴.

Trong nghiên cứu của chúng tôi BMI ảnh hưởng đến mật độ xương tại 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi và cột sống thắt lưng. BMI tăng thì mật độ xương cũng tăng, cụ thể BMI tăng lên 1 thì mật độ xương tăng 0,012 g/cm² tại vị trí cổ xương đùi, tăng 0,016 g/cm² tại vị trí đầu trên xương đùi và 0,018g/cm² tại vị trí cột sống thắt lưng. Gen *FTO* biểu hiện mạnh ở vùng dưới đồi ảnh hưởng đến hành vi ăn uống và cảm giác thèm ăn. Trên người Việt Nam tuy chưa có nghiên cứu trực tiếp tại SNP rs1121980 liên quan đến mật độ xương nhưng đã có 2 nghiên cứu trên trẻ em Tiểu học và mầm non cho thấy SNP rs 9939609, 1 SNP cùng nằm trên intron 1 với SNP rs1121980 làm tăng nguy cơ béo phì tức là làm tăng BMI mà BMI tăng lại là một yếu tố bảo vệ với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh Việt Nam.

4.3.11. Tương quan tuyến tính đa biến của các đa hình gen MTHFR rs1801133, LRP5 rs41494349, FTO rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh

Sau khi phân tích tương quan tuyến tính đa biến của mỗi đa hình gen và các yếu tố liên quan đến với mật độ xương. Chúng tôi sẽ đưa cả 3 đa hình gen và các yếu tố nguy cơ vào phân tích tương quan tuyến tính đa biến ở mô hình lặn và mô hình đồng trội

- Bảng 3.29 trình bày tương quan tuyến tính đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí theo mô hình lặn. Ở mô hình này người có kiểu gen đồng hợp tử TT được giả định có ảnh hưởng với mật độ xương, còn các kiểu gen khác là CT và CC được giả định không có ảnh hưởng với mật độ xương được gộp chung vào một nhóm. Kết quả, cũng giống như khi phân tích tuyến tính đa biến với mỗi đa hình gen. Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở cả ba vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC và CT sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến mật độ xương như tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, khu vực sống, số con, số năm sau mãn kinh, hoạt động thể lực. Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác. Không đưa đa hình gen *FTO* rs1121980 vào phân tích ở mô hình lặn vì trong 566 phụ nữ sau mãn kinh được nghiên cứu không phát hiện kiểu gen TT của đa hình gen này. Bảng 3.30 trình bày tương quan tuyến tính đa biến giữa các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 và một số yếu tố liên quan với mật độ xương ở 3 vị trí theo mô hình đồng trội. Ở mô hình này người mang kiểu gen CT và TT được coi là có ảnh hưởng đối với mật độ xương và được phân tích riêng khi so sánh với kiểu gen bình thường CC làm tham chiếu. Kết quả, cũng giống như khi phân tích tuyến tính đa biến với mỗi đa hình gen. Người mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác. Người mang kiểu gen CT của đa hình gen *FTO* rs1121980 có khả năng tăng mật độ xương cột sống thắt lưng so với người mang kiểu gen CC sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ

khác. Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí sau khi đã kiểm soát các yếu tố nguy cơ khác.

Phương trình hồi quy tuyến tính đa biến ở vị trí cột sống thắt lưng là:

$$Y_{(BMD)} = -0,003 \times \text{tuổi} + 0,018 \times \text{BMI} - 0,040 \times \text{tiền sử gãy xương} - 0,005 \times \text{số năm sau mãn kinh} + 0,02 \times \text{hoạt động thể lực} - 0,078 \times \text{TT}(MTHFR) + 0,022 \times \text{CT}(FTO).$$

Cụ thể tại vị trí cột sống thắt lưng phụ nữ sau mãn kinh tăng 1 tuổi sẽ giảm 0,003 g/cm² mật độ xương, BMI tăng 1 sẽ tăng 0,018 g/cm² mật độ xương, có tiền sử gãy xương có nguy cơ giảm 0,040 g/cm² mật độ xương, số năm sau mãn kinh tăng 1 sẽ giảm 0,005 g/cm² mật độ xương, hoạt động thể lực đạt yêu cầu theo khuyến cáo của tổ chức y tế thế giới sẽ tăng 0,02 g/cm² mật độ xương, mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm 0,078 g/cm² mật độ xương, mang kiểu gen CT của đa hình gen *FTO* rs1121989 có khả năng tăng 0,02 g/cm² mật độ xương.

4.3.12. Một số điểm mạnh và điểm yếu của nghiên cứu

Một số điểm mạnh trong nghiên cứu này là: Thứ nhất, đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam phân tích ảnh hưởng của các gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 với bệnh loãng xương và mật độ xương trên phụ nữ sau mãn kinh. Thứ hai, nghiên cứu có cỡ mẫu đủ lớn (n = 566) đã phân tích được ảnh hưởng của một số gen và một số yếu tố nguy cơ với mật độ xương. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu là mới chỉ phân tích được 3 SNP của 3 gen. Vì vậy trong tương lai cần phân tích trên nhiều SNP và nhiều gen hơn để phát hiện các gen có ảnh hưởng đến mật độ xương người Việt.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu tính đa hình của các gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 với bệnh loãng xương và mật độ xương trên 566 phụ nữ sau mãn kinh (223 phụ nữ sau mãn kinh loãng xương và 343 phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương) tại Khoa Khám Bệnh và Khoa Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch Mai chúng tôi đưa ra kết luận

1. Phân bố kiểu gen và alen của các đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở phụ nữ sau mãn kinh loãng xương

- Đa hình gen *MTHFR* rs1801133: tỷ lệ% kiểu gen CC/CT/TT là 69,5/27,8/2,7; tỷ lệ% alen C/T là 83,4/16,6.

- Đa hình gen *LRP5* rs41494349: tỷ lệ% kiểu gen AA/AG/GG là 83,4/15,7/0,9; tỷ lệ% alen A/G là 91,3/8,7.

- Đa hình gen *FTO* rs1121980: tỷ lệ% kiểu gen CC/CT là 71,3/28,7; tỷ lệ% alen C/T là 85,7/14,3.

- Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phân bố kiểu gen và alen của đa hình gen *MTHFR* rs1801133, *LRP5* rs41494349, *FTO* rs1121980 ở nhóm phụ nữ sau mãn kinh loãng xương so với nhóm phụ nữ sau mãn kinh không loãng xương.

2. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen với mật độ xương và một số yếu tố nguy cơ loãng xương (phân tích đa biến, sau khi đã kiểm soát các yếu tố tuổi, BMI, tiền sử gãy xương, nơi sống, số con, số năm sau mãn kinh, hoạt động thể lực)

- Phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 có nguy cơ giảm mật độ xương ở 3 vị trí cổ xương đùi, đầu trên xương đùi, cột sống thắt lưng khi so với phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CC ở mô hình đồng trội. Tương tự ở mô hình lặn, phụ nữ sau mãn kinh

mang kiểu gen TT của đa hình gen này cũng có nguy cơ giảm mật độ xương tại ba vị trí khảo sát khi so với phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CC và kiểu gen CT.

- Kiểu gen CT của đa hình gen *FTO* rs1121980 dường như là yếu tố bảo vệ. Phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen này có sự tăng mật độ xương tại cột sống thắt lưng so với phụ nữ sau mãn kinh mang kiểu gen CC.

- Không thấy mối liên quan giữa đa hình gen *LRP5* rs41494349 với mật độ xương ở cả 3 vị trí khảo sát.

KHUYẾN NGHỊ

- Nên sàng lọc kiểu gen TT của đa hình gen *MTHFR* rs1801133 ở phụ nữ sau mãn kinh nhằm phát hiện sớm phụ nữ sau mãn kinh có nguy cơ giảm mật độ xương và loãng xương để có biện pháp dự phòng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Trần Thị Thu Huyền**, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Ngọc Lan (2020)” Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MTHFR rs1801133 với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh” *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 8/2020, trang 271 – 276.
2. **Trần Thị Thu Huyền**, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Ngọc Lan (2020)” Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen LRP5 rs41494349 với mật độ xương ở phụ nữ sau mãn kinh” *Tạp chí Y học thực hành*, tháng 6/2020, trang 69 – 72.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhu X, Bai W, Zheng H. Twelve years of GWAS discoveries for osteoporosis and related traits: advances, challenges and applications. *Bone Research*. 2021; 9(1): 23.
2. Salari N, Ghasemi H, Mohammadi, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2021;16(1):1-20.
3. Ho-Pham LT, Nguyen UD, Pham HN, et al. Reference ranges for bone mineral density and prevalence of osteoporosis in Vietnamese men and women. *BMC musculoskeletal disorders*. 2011; 12(1):182.
4. Nguyễn Thị Thanh Hương. Osteoporosis, a major health problem in Vietnam-Life style factors and determinants of bone mass. *Departement of Women's and Children's Health Karolinska Institutet , Stockholm*; 2012
5. Peacock M, Charles H, Michael J, et al . Genetics of osteoporosis. *Endocrine reviews*. 2002; 23(3): 303-326.
6. Al-Barghouthi BM, Farber CR . Dissecting the genetics of osteoporosis using systems approaches.*Trends in Genetics*. 2019; 35(1): 55-67.
7. Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, et al (2003). A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 723-729.
8. Hong X, Hsu YH, Terwedow H, et al. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and fracture risk in Chinese postmenopausal women. *Bone*. 2007; 40(3): 737-742.
9. Shiraki M, UranoT, Kuroda T, et al. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26: 595-602.

10. Rodgers GM, Conn MT. Homocystein, an atherogenic stimulus reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*, 1990; (75): 895 - 901.
11. Koh JM, Jung MH, Hong JS, et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. *Journal of Korean medical science*. 2004; 19(3): 407-412.
12. Urano T, Shiraki M, Narusawa K, et al. Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine*. 2007; 32(1): 25-29.
13. Zhang ZL, Qin YJ, He JW, et al. Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin*. 2005; 26(9): 1111-1116.
14. Shen GS, Zhou HB, Zhang H, et al. The GDF11-FTO-PPAR γ axis controls the shift of osteoporotic MSC fate to adipocyte and inhibits bone formation during osteoporosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2018; 1864(12): 3644-3654.
15. Tran B, Nguyen ND, Center JR, et al. Association between fat-mass-and-obesity-associated (FTO) gene and hip fracture susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014; 81(2): 210-217.
16. Nguyễn Thị Ngọc Lan (2019). *Bệnh học cơ xương khớp nội khoa*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
17. Nguyễn Văn Tuấn và Nguyễn Đình Nguyên (2007). *Loãng xương nguyên nhân, chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa*, Nhà xuất bản Y học.
18. Kung AW, Lee KK, Ho AY, et al. Ten-year risk of osteoporotic fractures in postmenopausal Chinese women according to clinical risk factors and BMD T-scores: a prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007; 22(7): 1080-1087.

19. Baim S, Leonard MB, Bianchi ML, et al. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *Journal of clinical densitometry*. 2008; 11(1): 75-91.
20. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Annals of clinical biochemistry*. 2018; 55(3): 308-327.
21. Hồ Phạm Thục Lan, Nguyễn Văn Tuấn. Sinh lý học loãng xương, *Tạp chí Thời sự y học*. 2011; 7: 62.
22. Saied NH, Ahmmad MM, Ali NK. Prevalence of menopausal symptoms and its relationship with socio-demographic factors among women above 45 years in Mosul, Iraq. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2021; 16(1): 1-11.
23. Mai Thế Trạch và Nguyễn Thy Khuê (2007). *Nội tiết học đại cương*, Nhà xuất bản y học.
24. Tsartsalis AN, Dokos C, Kaiafa GD, et al. Statins, bone formation and osteoporosis: hope or hype. *Hormones*. 2012; 11(2): 126-139.
25. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology*. 2016; 31(3): 233-245.
26. Kuiper GG, Van den Bemd GJ, Van Leeuwen JP. Estrogen receptor and the SERM concept. *Journal of endocrinological investigation*. 1999; 22(8): 594-603.
27. Bord S, Horner A, Beavan S, et al. Estrogen Receptors α and β Are Differentially Expressed in Developing Human Bone 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001; 86(5): 2309-2314.
28. Khalid AB, Krum SA. Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone*. 2016; 87: 130-135.

29. Vanderschueren D, Vandeput L, Boonen S, et al. Androgens and bone. *Endocr Rev.* 2004; 25: 389-425.
30. Nguyen Thi Thanh Huong, Von Schoultz B, Nguyen Van Tuan, et al. Sex hormone levels as determinants of bone mineral density and osteoporosis in Vietnamese women and men. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2015; 33(6): 658-665
31. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis 1. *Endocrine reviews.* 2000; 21(2): 115-137.
32. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, et al. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 1983; 72(4):1396-1409.
33. Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodelling; implications for the understanding of osteoporosis. *Fundamentals of osteoporosis, Academic Press, New York;*2009
34. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1996; 11(10): 1531-1538.
35. Hà Hùng Thủy (2008). Mãn kinh và những thay đổi về xương, *Sức khỏe đời sống.*2008; 9: 78-79.
36. Carolyn B Becker MD, Adi Cohen, Clifford J Rosen, Jean E Mulder MD. Epidemiology and etiology of premenopausal osteoporosis. *Uptodate* 2010, 2010: p. Last literature review version 18.2: May 2010 | This topic last updated: July 30, 2009 (More).
37. Christodoulou C, Cooper C . What is osteoporosis. *Postgrad Med J.* 2003; 79: 133-138.

38. Plenary Lectures Abstracts. IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 2010; 21: p. [Suppl1]S1-S6.
39. Pongchaiyakul C, Nguyen TV, Kosulwat V, et al. Effect of urbanization on bone mineral density: a Thai epidemiological study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2005; 6: 5.
40. Marquez MA, Muhs JM, Crowson CS. Bone density in an immigrant population from Southeast Asia. *Osteoporos Int.* 2001; 12: 595-604.
41. Nguyễn Trung Hoà (2013). Tỷ lệ loãng xương và một số yếu tố liên quan ở người từ 45 tuổi trở lên ở Thành phố Hồ Chí Minh năm 2011. *Tạp chí y học dự phòng.* 2013; 7 (143): 93.
42. Kruger MC, Wolber FM. Osteoporosis: Modern Paradigms for Last Century's Bones. *Nutrients.* 2016; 8(6).
43. Wee J, Sing BY, Shen L, et al. The relationship between body mass index and physical activity levels in relation to bone mineral density in premenopausal and postmenopausal women. *Arch Osteoporos.* 2013; 8: 162.
44. Mazocco L, Chagas P. Association between body mass index and osteoporosis in women from northwestern Rio Grande do Sul. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2017; 57(4): 299-305.
45. Tao Y, Tang S, Huang X, et al. Prevalence and risk factors of osteoporosis in Chinese postmenopausal women awaiting total knee arthroplasty. *Clinical Interventions in Aging.* 2021; 16: 379.
46. Chapurlat RD, Garnero P, Sornay-Rendu E, et al. Longitudinal study of bone loss in pre- and perimenopausal women: evidence for bone loss in perimenopausal women. *Osteoporos Int.* 2000; 11(6): 493-498.

47. Hillel N Rosen M.D , Marc K Drezner M.D, Clifford J Rosen MD, Kenneth E Schmader MD, Jean E Mulder MD. Overview of the management of osteoporosis in postmenopausal women. *Uptodate* 2010, 2010: p. Last literature review version 18.2: May 2010 | This topic last updated: June 14, 2010 (More).
48. Dương Thanh Bình . Thực trạng loãng xương ở phụ nữ mãn kinh đến khám tại Bệnh viện Hữu nghị Việt nam - Cu ba Đồng Hới, *Tạp chí thông tin khoa học và công nghệ Quảng Bình*. 2018; 5: 79 - 81.
49. Hoàng Thị Bích, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Hoàng Hoa Sơn và cộng sự. Khảo sát yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ miền bắc Việt Nam từ 60 tuổi trở lên", *Tạp chí Nội khoa Việt Nam*. 2014; 12: 185- 190.
50. Nguyễn Văn Lành. Tình trạng loãng xương và một số yếu tố liên quan ở phụ nữ mãn kinh tại Hậu Giang, *Tạp chí Y học dự phòng*. 2016; XXVI(15): 118.
51. Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Lâm, Lưu Hồng Anh và cộng sự . Thiếu vitamin D và các yếu tố liên quan ở phụ nữ 15-49 tuổi tại Hà Nội và Hải Dương. *Tạp chí dinh dưỡng và thực phẩm*. 2007; 6 (3): 40-46.
52. Wu J, Shang DP, Yang S. Association between the vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis. *Biomedical reports*. 2016; 5(2): 233–236.
53. Harold N Rosen, C.J.R., Kenneth E Schmader, Jean E Mulder. Calcium and vitamin D supplementation in osteoporosis. *Uptodate* 2013, 2013. Literature review current through: Mar 2013. | This topic last updated: Feb 27, 2013.
54. WHO Global NCD Infobase. 2009; Available from: http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/en/. Accessed april 16, 2016.

55. Kistler-Fischbacher M, Weeks BK, Beck BR, et al. The effect of exercise intensity on bone in postmenopausal women (part 2): A meta-analysis. *Bone*. 2021; 143: 115697.
56. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocrine reviews*. 2010; 31(5): 629-662.
57. Xu F, Li W, Yang X ,et al. The Roles of Epigenetics Regulation in Bone Metabolism and Osteoporosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 25(8): 619301.
58. Rocha-Braz MG, Ferraz-de-Souza B (2016). Genetics of osteoporosis: searching for candidate genes for bone fragility. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2016; 60(4): 391-401.
59. Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature genetics*.1994; 7(2): 195-200.
60. Tran P, Leclerc D, Chan M, et al. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mammalian Genome*. 2002; 13(9): 483-492.
61. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe MTHFR deficiency. *Am J Hum Genet*.1995; 56: 1052 - 1059.
62. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, et al (2015). Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients*. 2015; 7: 6670-6687.
63. Brambila-Tapia AJ, Durán-González J, Sandoval-Ramírez L, et al. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Disease Markers*. 2012; 32: 109-114.

64. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocystein induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest.*1986; 77: 1909 - 1916.
65. De Martinis M, Sirufo MM, Nocelli C, et al. Hyperhomocysteinemia is Associated with Inflammation, Bone Resorption, Vitamin B12 and Folate Deficiency and MTHFR C677T Polymorphism in Postmenopausal Women with Decreased Bone Mineral Density. *International journal of environmental research and public health.* 2020; 17(12): 4260.
66. Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, et al. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 51(3): p. 579-590.
67. Saito M, Marumo K (2018).The effects of homocysteine on the skeleton. *Current osteoporosis reports.* 2013; 16(5): 554-560.
68. Roman Thaler, Marlies Agsten, Varga F. Homocysteine Suppresses the Expression of the Collagen Cross-linker Lysyl Oxidase Involving IL-6, Fli1, and Epigenetic DNA Methylation. *The journal of biological chemistry.* 2011; 286(7): 5578-5588.
69. Tyagi N, Kandel M, Munjal C, et al. Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: role of folic acid. *J Orthop Res.* 2011; 29(10): 1511-1516.
70. McLean R R, Karasik D, Selhub J, et al. Association of a common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bone phenotypes depends on plasma folate status. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2004; 19(3): 410-418.
71. Villadsen MM, Bunger MH, Carstens M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporosis international.* 2005; 16(4): 411-416.

72. Zhu K, Beilby J, Dick IM et al. The effects of homocysteine and MTHFR genotype on hip bone loss and fracture risk in elderly women. *Osteoporosis international*. 2009; 20(7): 1183-1191.
73. Li'dia Agueda, Roser Urreiziti, Bustamante M. Analysis of Three Functional Polymorphisms in Relation to Osteoporosis Phenotypes: Replication in a Spanish Cohort. *Calcif Tissue Int*. 2010; 87: 14-24.
74. Wang H, Liu C. Association of MTHFR C667T polymorphism with bone mineral density and fracture risk: an updated meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2012; 23(11): 2625-2634.
75. Brambila-Tapia AJL, Durán-González J, Sandoval-Ramírez L, et al. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Disease markers*. 2012; 32(2): 109-114.
76. Tungtrongchitr A, Preutthipan S. Association of MTHFR C677T polymorphism with bone mineral density of osteoporosis in postmenopausal Thai women. *J Med Assoc Thai*. 2013; 96(2): 133-139.
77. Li HZ, Wang W, Liu YL, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase c. 677C> T polymorphism and bone mineral density: an updated meta-analysis. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016; 291(1): 169-180.
78. Chen X, Zhang W, Huang J. Correlation between methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene rs1801133 C> T polymorphisms and risk of osteoporosis. *Pteridines*. 2021; 32(1): 117-125.
79. Nakano M, Yui H, Kikugawa S, et al. Associations of LRP5 and MTHFR gene variants with osteoarthritis prevalence in elderly women: A Japanese cohort survey randomly sampled from a basic resident registry. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2021; 17: 1065.

80. Guan JZ, Wu M, Xiao YZ, et al. MTHFR C677T polymorphism and osteoporotic fracture in postmenopausal women: a meta-analysis. *Genetics and molecular research*. 2014; 13(3): 7356-7364.
81. Soewarlan WDHP, Joenoes H, Bawazier SA. Distribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in postmenopausal Indonesian women with osteoporosis—A preliminary study. *In AIP Conference Proceedings*. 2019; 2092(1): 030023.
82. Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001; 107(4): 513-523.
83. Babij P, Zhao W, Small C, et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003; 18(6): 960-974.
84. Saarinen A. Genetic variation in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene: Association with bone health and metabolic parameters. *Folkhälsan Institute of Genetics, Department of Medical Genetics Faculty of Medicine University, Helsinki*; 2011.
85. Baron R, Kneissel M. Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine*. 2013; 19(2): 179-192.
86. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(22): 5525.
87. Astiazarán MC, Cervantes-Sodi M, Rebolledo-Enríquez E, et al. Novel homozygous LRP5 mutations in Mexican patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2017; 21(12): 742-746.
88. Korvala J, Jüppner H, Mäkitie O, et al. Mutations in LRP5 cause primary osteoporosis without features of OI by reducing Wnt signaling activity. *BMC medical genetics*. 2012; 13(1): 1-10.

89. Huybrechts Y, Mortier G, Boudin E, et al. Wnt signaling and bone: lessons from skeletal dysplasias and disorders. *Frontiers in Endocrinology*. 2020; 11: 165.
90. Kwee ML, Balemans W, Cleiren E, et al. An autosomal dominant high bone mass phenotype in association with craniosynostosis in an extended family is caused by an LRP5 missense mutation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005; 20(7): 1254-1260.
91. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009; 10(7): 468-477.
92. Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2006; 7(1-2): 33-39.
93. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Current opinion in rheumatology*. 2007; 19(4): 376-382.
94. Kitjaroenthom A, Hananantachai H, Phonrat B, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 gene polymorphisms and osteoporosis in Thai menopausal women. *Journal of negative results in biomedicine*. 2016; 15(1): 1-10.
95. Yang Z, Yu G L, Zhu X, et al. Critical roles of FTO-mediated mRNA m6A demethylation in regulating adipogenesis and lipid metabolism: Implications in lipid metabolic disorders. *Genes & Diseases*. 2022; 9(1): 51-61.
96. Yeo GS, O'Rahilly S. Uncovering the biology of FTO. *Mol Metab*. 2012; 1(1-2): 32-6.
97. Guo Y, Liu H, Yang TL, et al. The fat mass and obesity associated gene, FTO, is also associated with osteoporosis phenotypes. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27312.

98. Fischer J, Koch L, Emmerling C, et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*. 2009; 458(7240): 894-898.
99. Church C, Lee S, Bagg E, et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS genetics*. 2009; 5(8): e1000599.
100. Gao X, Shin YH, Li M, et al. The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PloS one*. 2010; 5(11): e14005.
101. Sachse G, Church C, Stewart, M, et al. FTO demethylase activity is essential for normal bone growth and bone mineralization in mice. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2018; 1864(3): 843-850.
102. Larder R, Cheung MM, Tung YL, et al. Where to go with FTO?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011; 22(2): 53-59.
103. Chen X, Hua W, Huang X, et al. Regulatory role of RNA N6-methyladenosine modification in bone biology and osteoporosis. *Frontiers in endocrinology*. 2020; 911.
104. Garg G, Kumar J, McGuigan FE, et al. Variation in the MC4R gene is associated with bone phenotypes in elderly Swedish women. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88565.
105. Trần Đức Phần, Lương Thị Lan Anh. Di truyền y học, *Nhà xuất bản Giáo dục Việt nam*; 2021.
106. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics*. 1995; 7(1): 9-18.
107. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphin Analysis of PCR- RFLP end Gel Electrophoresis- Valuable. *Tool for Genetic Fingerprinting*. 2012; (2): 315- 325.

108. Hans D, Downs J, Duboeuf R, et al. Skeletal sites for osteoporosis diagnosis: the 2005 ISCD Official Positions. *Journal of Clinical Densitometry*. 2006; 9(1): 15-21.
109. Siris ES, Adler R, Bilezikian, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporosis international*. 2014; 25(5): 1439-1443.
110. National Library of Medicine. *dbSNP*. Available at: <http://ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Accessed April 12, 2022.
111. Lim JU, Lee JH, Kim JS, et al. Comparison of World Health Organization and Asia-Pacific body mass index classifications in COPD patients. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2017; 12: 2465.
112. Bonn SE, Lagerros YT, Christensen SE, et al. Active-Q: validation of the web-based physical activity questionnaire using doubly labeled water. *Journal of medical Internet research*. 2012; 14(1): e1974.
113. Hoàng Văn Dũng, Lê Bạch Mai, Nguyễn Thị Ngọc Lan. Khảo sát mật độ xương bằng phương pháp siêu âm định lượng vị trí gót chân, một số yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ sau mãn kinh tại khu vực ngoại thành Hà Nội. *Tạp chí Y Dược lâm sàng 108*. 2016; 11(3): 192 - 197.
114. Tào Minh Thúy, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Vĩnh Ngọc và cộng sự.. Khảo sát các yếu tố nguy cơ loãng xương ở phụ nữ miền Bắc Việt Nam từ 50 tuổi trở lên, *Tạp chí Nội khoa Việt Nam*. 2013; Số đặc biệt tháng 10: 243-249.
115. Bui Van Tan, Christopher LB, Lương Ngọc Khuê và cộng sự. Physical Activity in Vietnam: Estimates and Measurement Issues. *PLoS One*. 2015; 10: 10.

116. Nguyễn Thị Thanh Mai, Lê Thị Hải Hà. Khảo sát mật độ khoáng xương ở bệnh nhân nữ thoái hóa khớp gối sau mãn kinh, *Tạp chí Y học Việt nam*. 2021; 5 (502): 141 - 146
117. Nguyen Thi Thanh Huong, Von Schoultz B, Nguyen Van Tuan. Peak bone mineral density in Vietnamese women, *Arch Osteoporos*. 2009; 4: 9-15.
118. Hồ Phạm Thục Lan, Phạm Ngọc Hoa, Lại Quốc Thái và cộng sự. Chẩn đoán loãng xương: ảnh hưởng của giá trị tham chiếu, *Tạp chí Y Học- Hội Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2011; 1 - 2.
119. Sassan Pazirandeh MD, David L Burns MD, Timothy O Lipman MD, Kathleen J Motil, MD PhD, Jean E Mulder MD. Overview of vitamin D. *Uptodate 2010*, 2010: p. Last literature review version 18.2: May 2010 | This topic last updated: May 19, 2010 (More).
120. De Laet C, Kanis JA, Oden A et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005; 16(11): 1330-1338.
121. Margaret Rees. Management of the menopause: integrated health-care pathway for the menopausal woman. *Menopause International*. 2011; 17: 50-54.
122. Harlow SD, Gass M, Hall JE et al (2012). Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(4), p. 1159-1168.
123. The North American Menopause Society (NAMS). NAMS continuing medical education activity Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *The Journal of The North American Menopause Society*. 2010; 17(1): 23-24.

124. Odell W, Burger H. Menopause and hormone replacement. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2012; 3: 2156-2157.
125. Nilsson M, Ohlsson C, Odén A, et al. Increased physical activity is associated with enhanced development of peak bone mass in men: A five-year longitudinal study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012; 27(5): 1206-1214.
126. Tariq S, Lone K.P, Tariq S. Comparison of parameters of bone profile and homocysteine in physically active and non-active postmenopausal females. *Pak J Med Sci*. 2016; 32(5): 1263-1267.
127. Langsetmo L, Hitchcock CL, Kingwell EJ, et al. Physical activity, body mass index and bone mineral density—associations in a prospective population-based cohort of women and men: The Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Bone*. 2012; 50(1): 401-408.
128. Vicente-Rodríguez G, Ara I, Perez-Gomez J, et al. Muscular development and physical activity as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *British journal of sports medicine*. 2005; 39(9): 611-616.
129. Muthuswamy S, Agarwal S. Do the MTHFR gene polymorphism and Down syndrome pregnancy association stands true? A case–control study of Indian population and meta-analysis. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2016; 17(1): 87-97.
130. Basol N, Karakus N, Savas AY, et al. The importance of MTHFR C677T/A1298C combined polymorphisms in pulmonary embolism in Turkish population. *Medicina*. 2016; 52(1): 35-40.
131. Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV, et al. Risk of non–hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005; 14(12): 2999-3003.

132. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *British Journal of Nutrition*. 2005; 94(2): 166-169.
133. Kurzwelly D, Knop S, Guenther M, et al. Genetic variants of folate and methionine metabolism and PCNSL incidence in a German patient population. *Journal of neuro-oncology*. 2010; 100(2): 187-192.
134. Nefic H, Mackic-Djurovic M, Eminovic I. The frequency of the 677C> T and 1298A> C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in the population. *Medical archives*. 2018; 72(3): 164.
135. Li Q, Lan Q, Zhang Y, et al. Role of one-carbon metabolizing pathway genes and gene–nutrient interaction in the risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer causes & control*. 2013; 24(10): 1875-1884.
136. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, et al. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res*. 2008; 7(1): 33-42.
137. Lincz LF, Scorgie FE, Kerridge I, et al. Methionine synthase genetic polymorphism MS A2756G alters susceptibility to follicular but not diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *British journal of haematology*. (2003); 120(6): 1051-1054.
138. Vidmar¹, M., A. Šmid, and N. Karas-Kuželčki. The influence of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate on the metabolic activity depending on changes in the folate cycle genes. *Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Centre Ljubljana, Slovenia*; 2017.

139. Joseph J, Loscalzo J. Methoxistasis: Integrating the Roles of Homocysteine and Folic Acid in Cardiovascular Pathobiology. *Nutrients*. 2013; 5(8): 3235 - 3256.
140. Sharp, Linda, Julian Little. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2004; 159(5): 423-443.
141. Refsum H, Smith A D, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical chemistry*. 2004; 50(1): 3-32.
142. Xu J, Wang H. Correlation of FTO gene polymorphisms with osteoporosis risk. *Internatinal journal of clinical and experimental pathology*. 2016; 9(10): 10740-10745.
143. Trần Quang Bình, Dương Văn Thanh, Bùi Thị Nhung và cộng sự. Tính đa hình và sự liên quan của SNP rs9939609 tại gen FTO với bệnh béo phì ở trẻ em tiểu học nội thành Hà Nội. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc về nghiên cứu và giảng dạy Sinh học ở Việt Nam lần thứ nhất*. 2012; 413-419.
144. Đỗ Nam Khánh (2020). *Nghiên cứu thực trạng thừa cân, béo phì và một số đặc điểm gen, thói quen dinh dưỡng, hoạt động thể lực ở trẻ mầm non*, Luận án Tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà nội.

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

“Nghiên cứu tính đa hình của một số gen

ở phụ nữ loãng xương sau mãn kinh”

1. Bộ câu hỏi sàng lọc

1.1. Thông tin cơ bản

STT	Câu hỏi	Có	Không
1	Bác có dưới 40 tuổi không?		
2	Bác đã mãn kinh chưa?		
3	Bác đã từng bị bất động hoặc óm nằm liệt giường hoặc ngồi xe đẩy từ 1 tháng trở lên bao giờ chưa?		
4	Từ trước tới giờ bác đã từng bị phẫu thuật cắt dạ dày chưa?		
5	Từ trước tới giờ bác đã từng bị phẫu thuật đoạn ruột chưa? (Trừ cắt ruột thừa)		
6	Từ trước tới giờ bác đã từng bị phẫu thuật cột sống chưa?		
7	Từ trước tới giờ bác đã từng bị phẫu thuật cắt bỏ 2 buồng trứng chưa?		
8	Từ trước tới giờ bác đã từng bị phẫu thuật cắt bỏ tử cung chưa?		
9	Khác		

1.4. Bệnh mạn tính

Từ trước tới giờ đã bao giờ bác được chẩn đoán là mắc các bệnh mạn tính dưới đây chưa?

STT	Tên bệnh	Có	Không	Nghi ngờ	Ghi chú
1	Bệnh suy thận				
2	Đi ngoài sống phân thương xuyên (lớn hơn 1 năm)				
3	Bệnh viêm gan mạn tính				
4	Bệnh xơ gan				
5	Bệnh ưu năng tuyến yên				
6	Bệnh nhược năng tuyến yên				
7	Bệnh ưu năng tuyến giáp				
8	Bệnh nhược năng tuyến giáp				
9	Bệnh calci máu cao hoặc cường tuyến cận giáp				
10	Bệnh calci máu thấp				
11	Bệnh ưu năng tuyến thượng thận				
12	Bệnh nhược năng tuyến thượng thận				
13	Bệnh đái tháo đường				
14	Bệnh Cushing				
15	Bệnh hệ thống và bệnh ác tính (Lupus ban đỏ, ung thư...)				
16	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính				
17	Bệnh khí phế thũng				
18	Bệnh xơ nang phổi				

19	Bệnh Hemophilia				
20	Bệnh suy tim xung huyết				
21	Bệnh leukemia				
22	Bệnh tăng calci huyết vô căn				
23	Bệnh thiếu hụt calci				
24	Bệnh thiếu phospho ở người trưởng thành				
25	Hội chứng Ehlers – Danlos				
26	Hội chứng Menkes Kinky				
27	Hội chứng Marfan				
28	Hội chứng Klinerfelter				
29	Khác				

1.5. Tiền sử dùng thuốc

Trong vòng 6 tháng qua bác đã bao giờ dùng các thuốc dưới đây?

STT	Tên thuốc	Có	Không
1	Uống, hít, tiêm, bôi thuốc có dẫn xuất corticosteroid (≥ 1 tháng)		
2	Dùng thuốc chống đông heparin, Coumarin		
3	Thuốc ức chế miễn dịch		
4	Hoá trị liệu		
5	Thuốc điều trị suy tuyến giáp		
6	Thuốc chống co giật		
7	Thuốc điều trị tâm thần		
8	Các chất kháng GnRH (lupron, leuprolide acetate...)		

2. Bệnh án nghiên cứu

2.1. Thông tin cơ bản

Họ và Tên:..... Tuổi:..... Số năm mãn kinh:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại:.....

Nghề nghiệp:.....

2.2. Các chỉ số nhân trắc

Chiều cao:..... Chiều cao tối đa:.....

Cân nặng:.....BMI:.....

2.3. Các chỉ số sinh tồn

Mạch:..... Huyết áp:.....

Nhiệt độ:..... Nhịp thở:

2.4. Tiền sử

2.4.1. Tiền sử loãng xương, gãy xương

* Bác đã bao giờ bị gãy xương chưa? Không Có Số lần:.....

Vị trí:.....

* Trong gia đình bác có ai (bố, mẹ, anh chị em ruột) bị loãng xương không?

Không Có Người bị loãng xương:.....

* Trong gia đình bác có ai (bố, mẹ, anh chị em ruột) bị gãy xương do loãng xương không?

Không Có Người bị gãy xương:.....

2.4.2. Tiền sử bệnh lý

Từ trước đến nay bác đã được chẩn đoán mắc bệnh gì mạn tính không?

Không Có Tên bệnh:.....

2.4.3. Tiền sử dùng thuốc

Bác có thường xuyên (trên 1 tháng) dùng một loại thuốc nào không?

Không Có Tên thuốc:.....

2.4.4. Tiền sử kinh nguyệt, thai nghén, sản phụ khoa

Tuổi bắt đầu hành kinh:..... Thời gian hành kinh:.....

Chu kỳ kinh nguyệt:.....

Kinh có đều không? Không Có

Tuổi mãn kinh:..... Tuổi tiền mãn kinh:.....

Bác đã có con chưa? Không Có Số con:.....

Con lần đầu năm bao nhiêu tuổi:.....

Hiện tại bác có cho con bú không? Không Có

Số lần mang thai:..... Số lần sinh non:..... Số lần sảy thai:.....

Bác đã bao giờ dùng thuốc tránh thai chưa? Không Có

Bác đã bao giờ dùng hormon thay thế sau mãn kinh chưa?

Không Có

2.5. Các chỉ số cận lâm sàng:

2.5.1. Mật độ xương: Máy Hologic – DXA. Đo tại CSTL và CXĐ.

	Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	T-score	PR (%)	Z- score	AM (%)
CSTL	L1							
	L2							
	L3							
	L4							
	Total							
CXĐ	Neck							
	Troch							
	Inter							
	Total							
	Ward's							

2.5.2 Các xét nghiệm máu.

Chỉ số	Kết quả	Chỉ số	Kết quả
HC (g/l)		Ure (mmol/l)	
HGB (g/l)		Creatinin (Mmol/l)	
Hct (l/l)		Cholesterol (mmol/l)	
BC (G/l)		TG/HDL/LDL (mmol/l)	
Ca TP (mmol/l)		GOT/GPT (U/L)	
Glucose (mmol/l)			

2.5.3. Kết quả phân tích gen

Kiểu gen	MTHFR rs1801133	LRP5 rs41494349	FTO rs1121980

Hà Nội, Ngày tháng năm 2015.

Phụ lục: Bộ câu hỏi hoạt động thể lực

(Dành cho đối tượng thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn vào nghiên cứu)

Hướng dẫn người phỏng vấn:

- Người phỏng vấn đọc các câu hỏi cho đối tượng nghiên cứu và để đối tượng nghiên cứu tự trả lời
- Người phỏng vấn gợi ý bằng cách đọc các đáp án nếu đối tượng nghiên cứu gặp khó khăn khi trả lời
- Khoanh tròn vào Mã tương ứng với câu trả lời mà đối tượng nghiên cứu lựa chọn

ĐỌC:Tôi sẽ hỏi ông/bà một số câu hỏi nhằm đánh giá mức độ hoạt động thể lực của ông/bà **trong vòng 1 năm vừa qua.**

Phần 1: Hoạt động thể lực trong thời gian làm việc

Q101	[phy_work]	Hiện tại ông/bà còn làm việc hay không?	Không Có	0 1	→ Q301 → Q102
Q102	[phy_work_freq]	Ông/bà làm việc bao nhiêu ngày mỗi tuần?	1 ngày/tuần 2 ngày/tuần 3 ngày/tuần 4 ngày/tuần 5 ngày/tuần 6 ngày/tuần 7 ngày/tuần	1 2 3 4 5 6 7	
Q103	[phy_work_dur]	Ông/bà làm việc bao nhiêu thời gian mỗi ngày?	1 giờ/ngày 2 giờ/ngày 3 giờ/ngày 4 giờ/ngày 5 giờ/ngày 6 giờ/ngày 7 giờ/ngày 8 giờ/ngày 9 giờ/ngày 10 giờ/ngày trở lên	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	

Q104	[phy_work_inte]	Mức độ vận động thể lực trong thời gian làm việc của ông/bà như thế nào?	Chủ yếu ngồi làm việc một chỗ	1	
			Ngồi làm việc, nhưng thỉnh thoảng có đứng lên đi lại	2	
			Phần lớn thời gian là đứng hoặc đi lại	3	
			Di chuyển thường xuyên kết hợp với lao động chân tay	4	
			Lao động chân tay nặng nhọc	5	

Phần 2: Hoạt động thể lực khi di chuyển tới nơi làm việc

Hướng dẫn người phỏng vấn:

- Đối tượng nghiên cứu có thể đi làm bằng 2 phương tiện, ví dụ nếu đi xe buýt thì sẽ gồm đi bộ ra bến xe, sau đó mới là đi xe buýt thực sự.
- Câu hỏi Q202: nếu đối tượng nghiên cứu chọn từ 2 phương tiện trở lên thì cần hỏi rõ để xác định thời gian sử dụng mỗi loại phương tiện nói riêng.

Q201	[phy_tran_]	Ông/bà hãy liệt kê TẤT CẢ các phương tiện mà ông/bà THƯỜNG XUYÊN sử dụng để đi làm?	Làm việc ở nhà	hom	→ Q301
			Đi bộ	wal	
			Xe đạp	bic	
			Xe máy	mor	
			Ô tô, taxi	car	
			Xe buýt	bus	

Q202 Tần suất và thời gian sử dụng mỗi loại phương tiện đã lựa chọn						
	Phương tiện	Tần suất [frq]		Thời gian(01 CHIỀU) [dur]		
Đi bộ	[phy_trans_wal_]	1 ngày/tuần	1	Dưới 15 phút	1	
		2 ngày/tuần	2	15-29 phút	2	
		3 ngày/tuần	3	30-44 phút	3	
		4 ngày/tuần	4	45-59 phút	4	
		5 ngày/tuần	5	60-89 phút	5	
		6 ngày/tuần	6	90-119 phút	6	
		7 ngày/tuần	7	120 phút trở lên	7	
	[phy_trans_bic_]	1 ngày/tuần	1	Dưới 15 phút	1	
		2 ngày/tuần	2	15-29 phút	2	

	Đi xe đạp	3 ngày/tuần	3	30-44 phút	3
		4 ngày/tuần	4	45-59 phút	4
		5 ngày/tuần	5	60-89 phút	5
		6 ngày/tuần	6	90-119 phút	6
		7 ngày/tuần	7	120 phút trở lên	7
	[phy_trans_mor_] Xe máy	1 ngày/tuần	1	Dưới 15 phút	1
		2 ngày/tuần	2	15-29 phút	2
		3 ngày/tuần	3	30-44 phút	3
		4 ngày/tuần	4	45-59 phút	4
		5 ngày/tuần	5	60-89 phút	5
		6 ngày/tuần	6	90-119 phút	6
		7 ngày/tuần	7	120 phút trở lên	7
	[phy_trans_car_] Ô tô, taxi	1 ngày/tuần	1	Dưới 15 phút	1
		2 ngày/tuần	2	15-29 phút	2
		3 ngày/tuần	3	30-44 phút	3
		4 ngày/tuần	4	45-59 phút	4
		5 ngày/tuần	5	60-89 phút	5
		6 ngày/tuần	6	90-119 phút	6
		7 ngày/tuần	7	120 phút trở lên	7
	[phy_trans_bus_] Xe buýt	1 ngày/tuần	1	Dưới 15 phút	1
		2 ngày/tuần	2	15-29 phút	2
		3 ngày/tuần	3	30-44 phút	3
		4 ngày/tuần	4	45-59 phút	4
		5 ngày/tuần	5	60-89 phút	5
		6 ngày/tuần	6	90-119 phút	6
		7 ngày/tuần	7	120 phút trở lên	7

Phần 3: Hoạt động thể lực trong thời gian giải trí

Q301	[phy_leiact_]	Ông/bà hãy liệt kê	Xem vô tuyến	tv	
		tất cả các hoạt động	Sử dụng máy vi tính,	com	
		mà ông/bà thường	ipad...		
		xuyên thực hiện	Đọc sách báo	rea	
		trong thời gian rảnh	Ngồi nói chuyện, nghe	sit	

		rồi	nhạc, đàn lát...		
		Tính cả các hoạt động thực hiện vào ban đêm (nếu có)	Làm việc nhà (lau nhà, trông trẻ con...)	hom	
			Nấu nướng	coo	
			Đi dạo	wal	
			Đi xe đạp với tốc độ vừa phải	bic	
			Di chuyển bằng xe máy hoặc dạo phố bằng xe máy	mor	

Q302 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn					
	Hoạt động	Tần suất (số ngày/tuần) [frq]		Thời lượng (phút/ngày) [dur]	
	Xem vô tuyến [phy_leiact_tv_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Sử dụng máy vi tính, điện thoại thông minh... [phy_leiact_com_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
			6 đến dưới 7 giờ	9	
			7 giờ trở lên	10	
	Đọc sách báo	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1

Q302 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn					
	Hoạt động	Tần suất (số ngày/tuần) [frq]		Thời lượng (phút/ngày) [dur]	
	[phy_leiact_rea_]	2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
		Ngồi nói chuyện, đan lát... [phy_leiact_sit_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống
	2 ngày		2	30-59 phút	2
	3 ngày		3	60-89 phút	3
	4 ngày		4	90-119 phút	4
	5 ngày		5	2 đến dưới 3 giờ	5
	6 ngày		6	3 đến dưới 4 giờ	6
	7 ngày		7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Làm việc nhà [phy_leiact_hom_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Nấu cơm [phy_leiact_coo_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3

Q302 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn					
	Hoạt động	Tần suất (số ngày/tuần) [frq]		Thời lượng (phút/ngày) [dur]	
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Đi bộ [phy_leiact_wal_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Đi xe đạp tốc độ vừa phải [phy_leiact_bic_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10
	Đạo phố bằng xe máy [phy_leiact_mor_]	1 ngày	1	29 phút trở xuống	1
		2 ngày	2	30-59 phút	2
		3 ngày	3	60-89 phút	3
		4 ngày	4	90-119 phút	4
		5 ngày	5	2 đến dưới 3 giờ	5

Q302	Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn				
	Hoạt động	Tần suất (số ngày/tuần) [frq]		Thời lượng (phút/ngày) [dur]	
		6 ngày	6	3 đến dưới 4 giờ	6
		7 ngày	7	4 đến dưới 5 giờ	7
				5 đến dưới 6 giờ	8
				6 đến dưới 7 giờ	9
				7 giờ trở lên	10

Phần 4: Hoạt động thể lực khi chơi thể thao

Q401	[phy_sport_]	Ông/bà hãy liệt kê tất cả các môn thể thao mà ông/bà thường xuyên thực hiện. <i>Thường xuyên tức là thực hiện ít nhất 1 lần/tháng.</i>	Tập thể dục aerobic	aer	
			Các bài tập tăng sức mạnh cơ (nâng tạ)	gym	
			Đi bộ nhanh	jog	
			Chạy bộ	run	
			Đạp xe tốc độ nhanh (thể thao)	bic	
			Bơi lội	swi	
			Bóng đá, bóng chuyền, bóng rổ	bal	
			Chơi gôn (golf)	gol	
			Khiêu vũ thể thao	dan	
			Võ thuật	mar	
			Đấm bốc	box	
			Ten-nít, bóng bàn, cầu lông	ten	
			Yoga	yog	
			Dưỡng sinh	tai	
			Môn thể thao khác (ghi rõ):	other	
Tôi không chơi thể thao	no	→ Q501			

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]		
Tập thể dục aerobic [phy_sport_aer_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1	
		1 lần/tuần	2	30-44 phút	2	
		2 lần/tuần	3	45-59 phút	3	
		3 lần/tuần	4	60-89 phút	4	
		4 lần/tuần	5	90-119 phút	5	
		5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6	
		6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7	
		7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8	

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
	Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]	
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Nâng tạ [phy_sport_gym_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Đi bộ nhanh [phy_sport_jog_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Chạy bộ [phy_sport_run_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
	Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]	
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Đạp xe tốc độ nhanh [phy_sport_bic_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Boi lội [phy_sport_swi_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Bóng đá, bóng chuyền, bóng rổ [phy_sport_bal_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
	Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]	
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Chơi golf [phy_sport_gol_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Khiêu vũ thể thao [phy_sport_dan_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ 4 giờ trở lên	9 10
	Võ thuật [phy_sport_mar_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
	Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]	
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10
	Đấm bốc [phy_sport_box_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10
	Ten-nít, bóng bàn, cầu lông [phy_sport_ten_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10
	Yoga [phy_sport_yog_]		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
			1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7

Q402 Tần suất và thời lượng thực hiện mỗi hoạt động đã lựa chọn						
	Môn thể thao	Thực hiện bao nhiêu tháng trong 01 năm?	Tần suất[frq]		Thời lượng (MỖI LẦN) [dur]	
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10
	Dưỡng sinh		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
	[phy_sport_tai_]		1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
			4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10
	Môn thể thao khác:		1-3 lần/tháng	1	29 phút trở xuống	1
		1 lần/tuần	2	30-44 phút	2
			2 lần/tuần	3	45-59 phút	3
			3 lần/tuần	4	60-89 phút	4
	[phy_sport_other_]		4 lần/tuần	5	90-119 phút	5
			5 lần/tuần	6	2 đến dưới 2.5 giờ	6
			6 lần/tuần	7	2.5 đến dưới 3 giờ	7
			7 lần/tuần	8	3 đến dưới 3.5 giờ	8
			8 lần/tuần trở lên	9	3.5 đến dưới 4 giờ	9
					4 giờ trở lên	10